



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“LOCALIZACIÓN DE LOS  
NEUROPEPTIDOS VIP, NPY Y  
CATECOLAMINAS (TH) A TRAVÉS DEL  
DESARROLLO DEL OVARIO DE POLLO”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGA**

PRESENTA:

**JESSICA TÉLLEZ RAMÍREZ**

DIRECTORA DE TESIS:

DOCTORA EN CIENCIAS MARGARITA V. GONZÁLEZ  
DEL PLIEGO OLIVARES

ASESORA INTERNA:

DOCTORA MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR





## *AGRADECIMIENTOS*



A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza que fue mi casa durante tantos años.

Al departamento de Embriología de la Facultad de Medicina por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

A la Doctora Margarita González del Pliego Olivares por su apoyo y dirección del trabajo.

A la Dra. María Elena Ayala Escobar por su orientación y su apoyo.

A la M en C. Elsa Liliana Aguirre Benítez por su invaluable colaboración técnica y ayuda en la realización de la tesis.

Al M. en C. Raúl Zavala Chavero, a la Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán y el Dr. José Luis Morán por sus excelentes observaciones en este trabajo.

A la Dra. Emma Rodríguez por su ayuda en la revisión de la tesis.

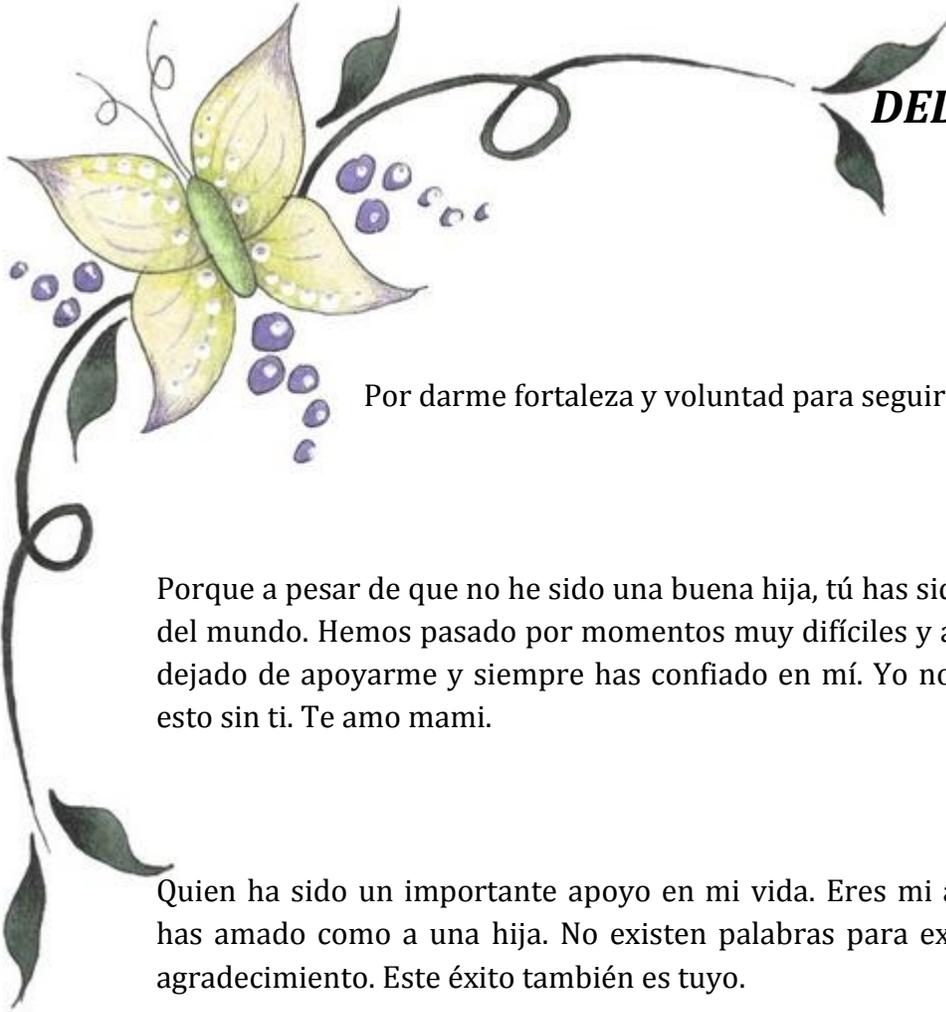
A la Maestra Verónica Rodríguez Mata por su contribución en los cortes para la técnica histológica.

A la Maestra Verónica Gasca y al Profesor Alfonso Velázquez por sus consejos en la realización de este trabajo.

A Guadalupe Feria por su apoyo en el trabajo de laboratorio y por su amistad.

Al Dr. Jose Rene Escalona por su apoyo y colaboración.

Este trabajo fue realizado con el apoyo de DGAPA con el número de proyecto IN206007.



## **DEDICATORIAS**

### **A DIOS**

Por darme fortaleza y voluntad para seguir adelante cada día.

### **A MAMI**

Porque a pesar de que no he sido una buena hija, tú has sido la mejor mamá del mundo. Hemos pasado por momentos muy difíciles y aun así nunca has dejado de apoyarme y siempre has confiado en mí. Yo no hubiera logrado esto sin ti. Te amo mami.

### **A MAMÁ LUCY**

Quien ha sido un importante apoyo en mi vida. Eres mi abuelita, pero me has amado como a una hija. No existen palabras para expresarte todo mi agradecimiento. Este éxito también es tuyo.

### **A MI GOGO**

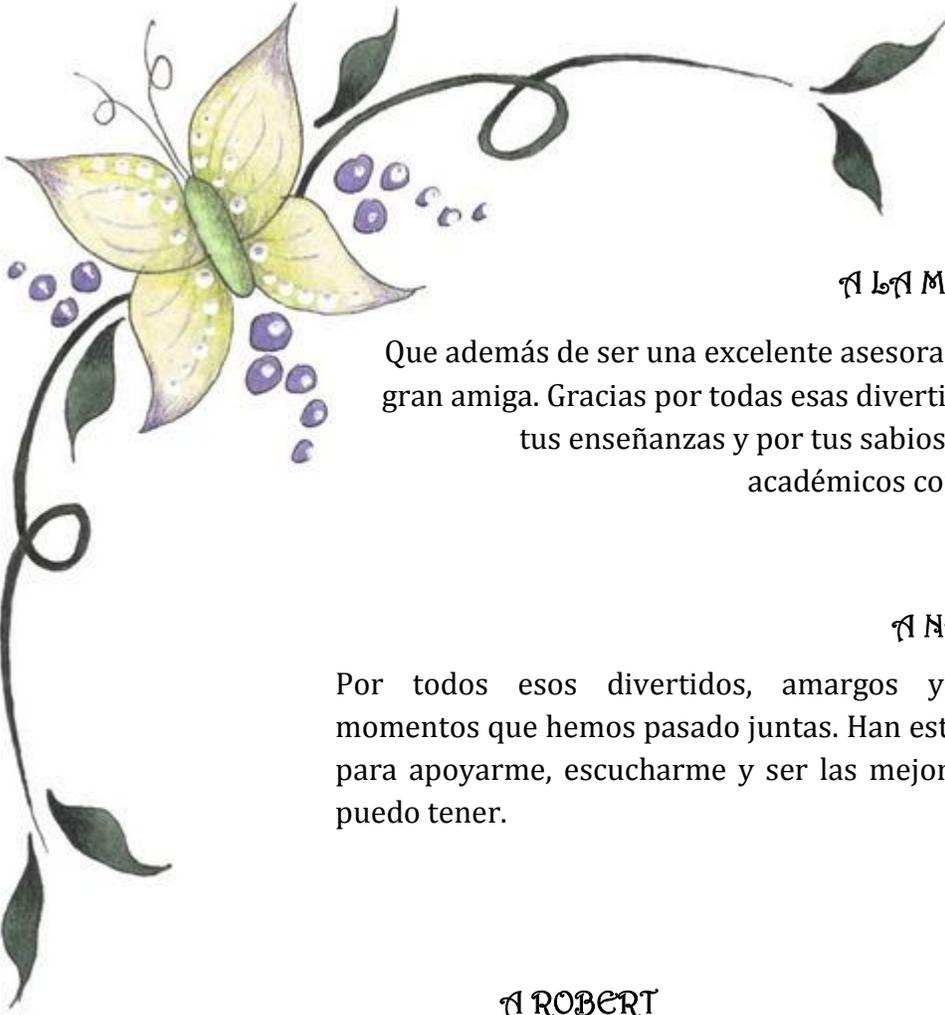
Que nos ha cuidado, apoyado y protegido como el hombre de la familia.

### **A MI HERMANITO TEÚL**

Quien me motiva cada día para superarme y me inspira con su apoyo y cariño para lograr mis metas. Eres el mejor hermano del mundo.

### **A RENE**

Tú le das sentido a todo. Me demostraste que vale la pena luchar por lo que se quiere y me enseñaste lo satisfactorio de compartir los grandes triunfos y superar las tormentas. Eres un buen maestro, un gran amigo y un excelente compañero. No importa que venga después, siempre y cuando tú estés incluido.



### A LA MAESTRA ELSA

Que además de ser una excelente asesora técnica, es una gran amiga. Gracias por todas esas divertidas peleas, por tus enseñanzas y por tus sabios consejos tanto académicos como personales.

### A NAILE Y DIANA

Por todos esos divertidos, amargos y bochornosos momentos que hemos pasado juntas. Han estado en mi vida para apoyarme, escucharme y ser las mejores amigas que puedo tener.

### A ROBERT

Amigo, eres el mejor. Siempre estás cuando te necesito y sabes cómo levantarme el ánimo, me dices las palabras adecuadas y me guste o no me haces ver mis errores. Tu sinceridad vale oro.

### A MIS AMIGOS

Julio, Mariano, Jaz, Mafer, Betty, Carlitos, Marce, Roberto Carlos, Claudia y Eli por ser una parte importantísima en mi vida.



ÍNDICE

1. **Resumen** ..... 1

2. **Introducción** ..... 3

3. **Marco teórico**

    3.1. Diferenciación gonadal en aves .....5

    3.2. Desarrollo embrionario del ovario de pollo .....6

    3.3. Ovogénesis .....11

    3.4. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada .....12

    3.5. Inervación del Ovario de Aves .....15

    3.6. Neuropeptidos .....16

        3.6.1. Neuropeptido Y (NPY) .....19

        3.6.2. Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) .....21

        3.6.3. Catecolaminas .....23

    3.7. Identificación de los Neuropeptidos y las catecolaminas en el ovario y su participación en las funciones ováricas .....26

4. **Planteamiento del problema** .....32

5. **Hipótesis y objetivos** .....33

6. **Material y Método** .....34

7. **Resultados** .....37

8. **Discusión** .....54

9. **Conclusiones** .....60

10. **Bibliografía** .....62



## RESUMEN

El desarrollo del ovario es regulado por el sistema neuroendocrino, conformado por el eje Hipotálamo-hipófisis-gónada (H-H-G) y el sistema neural, proveniente de la innervación intrínseca y extrínseca. Estos sistemas actúan en coordinación junto con otros factores para modular las funciones y el crecimiento ovárico.

La innervación autónoma es principalmente de origen simpático, por la cual llegan al ovario catecolaminas y neuropéptidos, como el neuropéptido Y (NPY) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP). Estos neuromoduladores han sido identificados en células neurales y no neurales en el ovario de mamíferos y se ha reportado que ambos neuropéptidos participan en la regulación del flujo sanguíneo, y que, junto con las catecolaminas, intervienen en el crecimiento folicular, la actividad reproductiva y la esteroidogénesis.

En las aves, aún no se sabe mucho acerca de la función y la regulación de los neuropéptidos en las gónadas, sin embargo, se han detectado fibras nerviosas VIPérgicas y catecolaminérgicas en el ovario de la gallina. En pollo se ha localizado NPY en el sistema nervioso central, a nivel del hipotálamo.

El objetivo del presente trabajo fue identificar las poblaciones celulares en las que se localizan las catecolaminas, a través de la enzima tiroxina hidroxilasa (TH) y los neuropéptidos VIP y NPY, durante el desarrollo embrionario y posteclosión del ovario izquierdo de pollo, empleando la técnica de inmunohistoquímica. Además, se utilizó el marcador de enolasa específica de neurona (NSE) para ubicar la presencia de fibras nerviosas en el ovario.

El estudio mostró que a partir del día 11 de incubación y hasta el día 15 posteclosión, existe la presencia de los neuropéptidos VIP y NPY y de la enzima TH en el ovario izquierdo de pollo. El VIP se localizó en el epitelio superficial del ovario en todas las edades estudiadas, mientras que el NPY mostró marcaje positivo en células epiteliales corticales solo en la etapa embrionaria. En esta misma etapa, la TH se localizó en fibras nerviosas de la médula profunda y tanto la TH como los neuropéptidos se localizaron en la médula subcortical, en fibras que inervan células esteroidogénicas, vasos sanguíneos,



canales lacunares; marcaje que se mantuvo hasta los 15 días posteclosión. En el caso de VIP, se observó un marcaje en el citoplasma de las células esteroidogénicas solo en la etapa embrionaria. VIP, NPY y TH se encontraron en ganglios adyacentes al ovario en todas las edades de este estudio. En los animales posteclosión, se observó la interacción de las poblaciones celulares de corteza y médula, y se reconoció la formación de los primeros folículos en la corteza ovárica. En estos animales, se distinguieron fibras nerviosas inervando folículos en crecimiento además de las fibras nerviosas que inervan células esteroidogénicas y vasos sanguíneos.

Las fibras nerviosas positivas a NSE se identificaron en la médula profunda e inervando células esteroidogénicas, vasos sanguíneos y folículos en crecimiento. También se observaron en ganglios adyacentes al ovario.

En conclusión, se demostró que VIP y NPY así como la enzima TH están presentes durante el desarrollo del ovario de pollo en diferentes poblaciones celulares desde los 11 días de incubación hasta los 15 días posteclosión.



## **INTRODUCCIÓN**

Durante el desarrollo de la gónada femenina, están involucrados diferentes eventos necesarios para constituir un ovario completamente funcional (Fargeix y col., 1981).

En mamíferos, además del mensaje hormonal que llega al ovario por medio del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, también está involucrada la vía neural, medio por el que a través de la inervación, le llegan a la gónada neurotransmisores y neuropéptidos, los cuales participan en la modulación de las funciones del ovario (Garraza y col., 2004; Jana y col., 2007; Keator y col., 2010).

En la rata se ha mostrado que por el nervio vago transcurren fibras sensoriales que transportan hacia el ovario el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la sustancia P (SP) y en menor cantidad el Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP). Al ovario también por las fibras nerviosas simpáticas llega principalmente VIP, el neuropéptido Y (NPY) y noradrenalina. Este último es un neurotransmisor y su presencia se ha reconocido por que se ha identificado a la Tirosina Hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de catecolaminas (Lara y col., 1990; Lara y col., 1991; Dissen y col., 2004).

Se considera que los neurotransmisores y neuropéptidos participan en la modulación de la actividad reproductiva debido a que actúan en el eje Hipotálamo-Hipófisis- Gónada, donde regulan la cascada de señalización hormonal que se produce en este eje y que culmina con la producción de hormonas que mantienen la estructura y funcionamiento del ovario, el órgano primario del aparato reproductor de la hembra (Burden, 1978; Ojeda y col., 1985; Lara y col., 1991; Mayerhofer y col., 1997). Algunos neuropéptidos también han sido relacionados con el desarrollo gonadal como es el caso de VIP en el humano (Alm y col., 1980, Palle y col., 1991)

En ratas se ha comprobado la presencia de un profuso sistema de fibras nerviosas inmunoreactivas para NPY, VIP y TH en el ovario, en los oviductos, cuello uterino y cérvix (Stjernquist y col., 1983). En el ovario de la gallina doméstica se ha localizado VIP en fibras nerviosas en las tecas de los folículos preovulatorios (Johnson y Tilly, 1988) y su receptor se ha detectado en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios y en



los folículos inmaduros del ovario de gallina (Kawashima y col., 1995), y también se ha propuesto la presencia de una extensa red de fibras nerviosas adrenérgicas relacionadas con las células productoras de esteroides y células musculares lisas, con los folículos en desarrollo y con los vasos sanguíneos (Dahl, 1970). El NPY no ha sido localizado en el ovario de gallina ni en el ovario de pollo, pero si se ha localizado en el cerebro de aves, por lo que se ha propuesto que juega un papel importante en el control de los sistemas neuroendocrino, vegetativo y sensitivo, como neuromodulador o neurotransmisor (Esposito y col., 2001).

El VIP se ha encontrado presente en fibras nerviosas distribuidas en el ovario de pollo, durante la etapa embrionaria y posteriormente en la foliculogénesis temprana durante la etapa posteclosión (Aguirre-Benítez y col, 2005 a y b). También han sido detectadas fibras de origen catecolaminérgico en la médula del ovario de pollo desde los 11 días de desarrollo y se ha determinado que a partir de los 15 días de incubación se establecen conexiones hacia las poblaciones celulares esteroideogénicas (Ávila y col., 1989; Ávila y col., 1991).

A pesar de que existen reportes de la ubicación del VIP y NPY y de la coexistencia de diversos neuropéptidos en el ovario de mamíferos y de humano, así como de su participación en la regulación de las funciones reproductivas (Ahmed y col., 1986; Kannisto y col., 1986; Markiewicz y col., 2003 a y b), en el ovario de las aves no hay suficiente información sobre la presencia de estos neuromoduladores ni de su posible papel durante su desarrollo y fisiología.

## MARCO TEÓRICO

- **Diferenciación gonadal en aves**

En las aves, el desarrollo del sistema reproductor inicia con la diferenciación de las gónadas. Este es un proceso ordenado y continuo donde interactúan factores genéticos, ambientales y hormonales, que inducen la expresión de una cascada de genes que conducen a la inhibición de la expresión de un sexo y favorecen la diferenciación del contrario (Burgoyne, 1988; Burns, 1961; Villalpando y col., 2000; Witschi, 1959).

La gónada inicialmente es bipotencial y está organizada en una corteza y médula. En la médula se forman los cordones primitivos sexuales, que en el testículo, llamado gónada ZZ, se transformarán en los cordones espermáticos; en la gónada femenina se desarrolla la estructura lacunar y se le nombra gónada ZW (Fig. 1). En la hembra, solamente la gónada izquierda crece y se desarrolla en un ovario funcional. La región cortical se expande en el ovario y en el testículo hay una regresión de esta (DeFalco y Capel, 2009; Fechheimer, 1990).

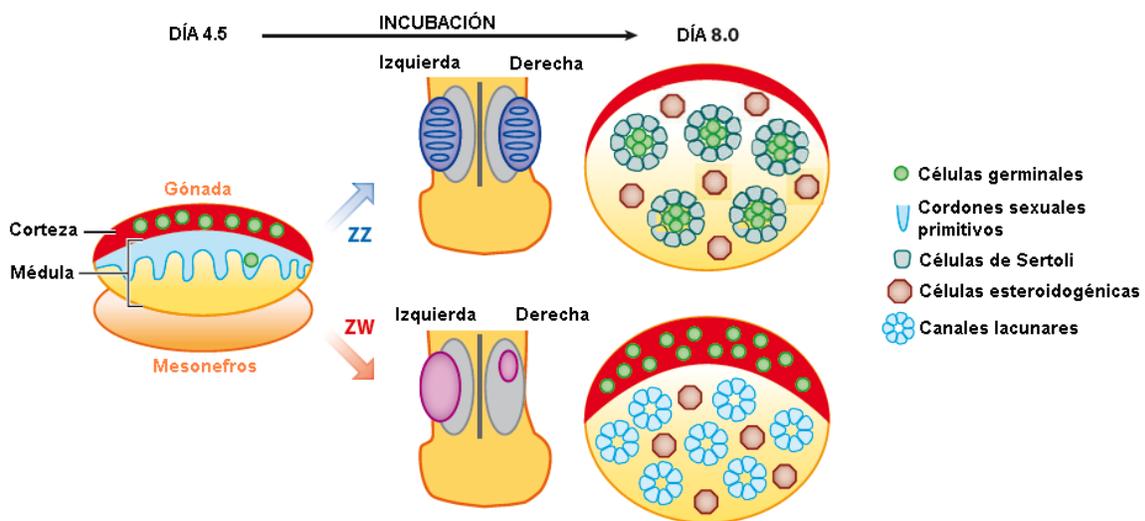
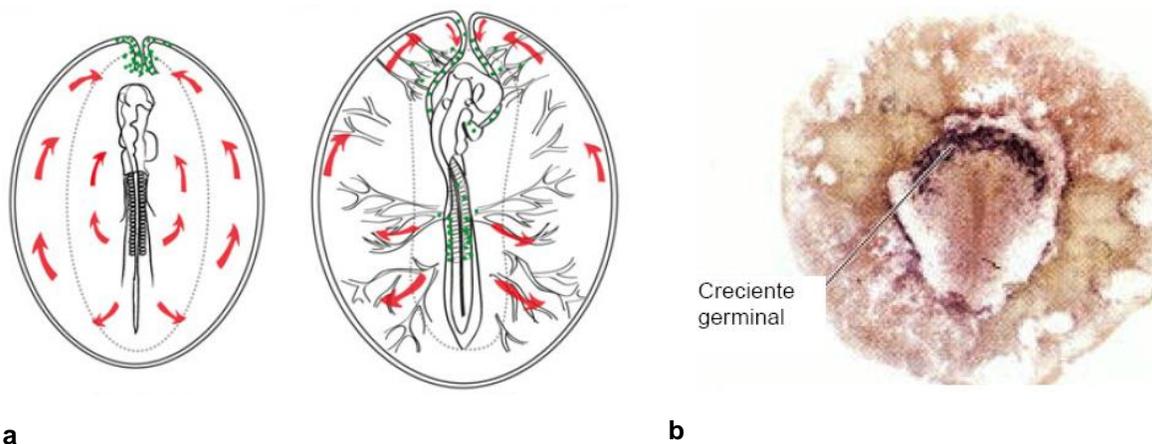


Fig. 1. Esquema que describe la morfogénesis de la gónada de pollo (Modificada de DeFalco y Capel, 2009).

- **Desarrollo embrionario del ovario de pollo**

El desarrollo gonadal ocurre en la etapa embrionaria e inicia con el establecimiento de la cresta urogenital (Ando y Fujimoto, 1983), que es inducida por el mesonefros; en el embrión de pollo se localizan a la altura de la 20 a la 27ª somita (Burns, 1961; Witschi, 1959).

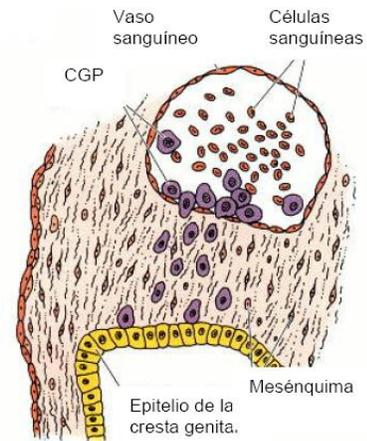
En este proceso participan las células germinales primordiales (CGP's), que en aves derivan de las células del epiblasto y migran desde la región central del área pelúcida hacia una zona en forma de semiluna en el hipoblasto, en el borde anterior del área pelúcida. Esta región extraembrionaria se conoce como creciente germinal y es ahí donde se multiplican las CGP's (Fig. 2) (Gilbert, 2000).



**Fig. 2. a) Nuevo modelo que plantea la migración de las células germinales primordiales (CGP's) del embrión de pollo. b) Creciente germinal de un embrión de pollo de 18 horas. Las CGP's en negro (tomada y modificada de De Melo y col., 2012 y Gilbert, 2000).**

Entre el 1o y el 2o días de incubación, las CGP's, se desplazan por medio de los vasos sanguíneos y salen de los capilares del mesenterio esplácnico posterior de la arteria onfalomesentérica rumbo a la cresta genital. Para entonces, las células del mesénquima de la cresta comienzan a organizarse en cordones de tipo epitelial (Fig. 3) (Ando y Fujimoto, 1983).

**Fig. 3. Diagrama de la migración de las CGP's a la gónada (Gilbert, 2000)**



En el 3er día de vida embrionaria, las CGP's se acumulan de forma simétrica en la parte derecha e izquierda del embrión (Sauveur, 1992); el epitelio superficial prolifera; se observan CGP's entre las células epiteliales, las células del mesénquima mas dorsales se reúnen y forman un segundo grupo de cordones epiteliales (Fargeix y col., 1981).

Durante el 4o día de incubación, muchas CGP's se transfieren de la gónada derecha a la izquierda y esta entonces, tiene cinco veces más CGP's que la derecha. Las CGP's se incorporan al llamado epitelio germinal y las otras células de este epitelio son de origen mesenquimático (peritoneal) (Swift 1915; Venzke, 1954).

En el 5o día de incubación, la gónada es una estructura constituida por el epitelio superficial, la corteza y la médula. La red de cordones mesodérmicos unen la gónada al mesonefros; en la hembra, al sexto día y medio de incubación, finaliza el estadio indiferente y se forma la *rete ovarii* (Carlton y Stahl, 1985).

En el 6o y 7o días de incubación, el epitelio germinal da origen a los cordones sexuales primarios, que en la hembra forman la médula ovárica y contribuyen a la constitución de las células intersticiales medulares (Carlton y Stahl, 1985).

En el día 6.5 del desarrollo, morfológicamente se puede determinar el sexo al observar el epitelio germinal, que ya contiene gran cantidad de CGP's. Asimismo, en las gónadas femeninas se identifica la expresión del gen de la aromatasa, que es necesaria para la conversión de testosterona a  $17\beta$ -estradiol (Fig. 4). Estas

evidencias indican que la diferenciación de la gónada ocurre a más tardar en el día 5.5 día de incubación (Romanoff, 1960). Los eventos que marcan el desarrollo de las gónadas en las aves se presentan en la figura 4.

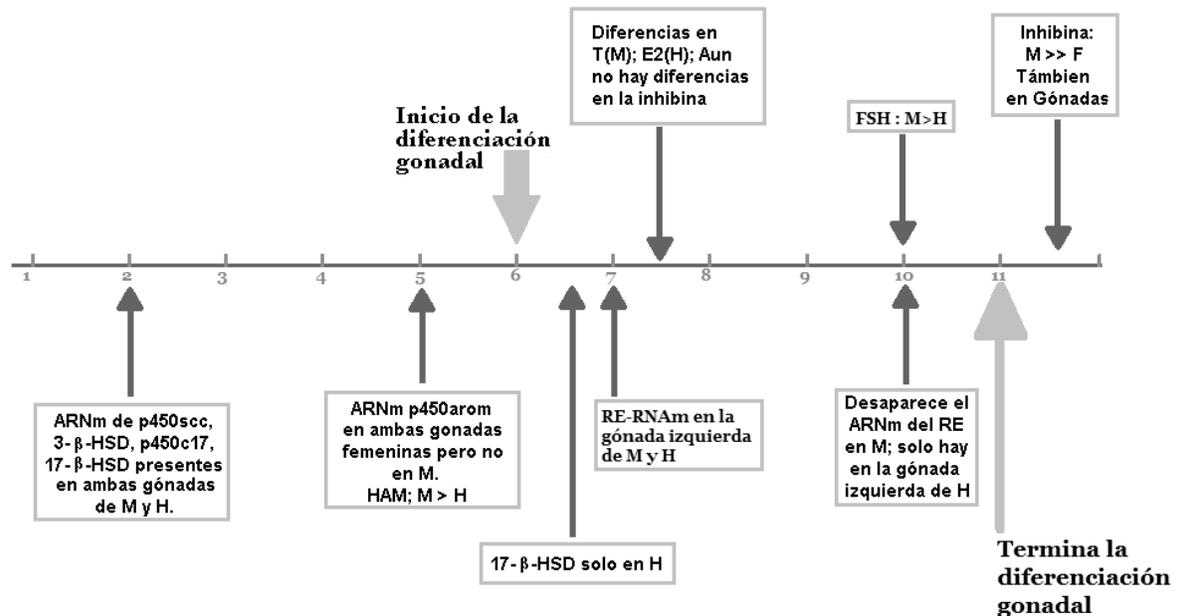


Fig. 4. Esquema que muestra el momento en que las hormonas aparecen en el plasma y el inicio de la expresión de las enzimas que están involucradas en la esteroidogénesis durante los primeros 12 días de incubación. (M) embriones de pollo machos, (H) embriones de pollo hembras, (HAM) hormona antimülleriana, (RE) receptor a estrógenos, (T) testosterona, (E2) 17β-estradiol, β-HSD β-hidroxiesteroideshidrogenasa, (FSH) hormona estimulante de los folículos (Modificado de Bruggeman y col., 2002).

Al 8o día de incubación ya se detecta actividad esteroidogénica en la gónada (Weniger y col., 1990). Con base en estudios morfológicos e histoquímicos, se ha establecido la presencia de agrupamientos de células esteroidogénicas en la médula del ovario de embrión de pollo (Galli y Wasserman, 1973; Scheib y Baulieu, 1981; Woods y Ertón, 1978). A partir de este momento y hacia el 11o día de incubación, el epitelio cortical prolifera y da origen a una serie de cordones sexuales secundarios, formados por ovogonias y por elementos mesenquimáticos, estos últimos dan origen a las células endocrinas o células intersticiales corticales (Getty, 1982). Alternativamente estas células intersticiales corticales se entremezclan con las células intersticiales medulares que han migrado hacia la



corteza; los cordones sexuales secundarios y las ovogonias (y las células intersticiales corticales) que surgen de ellas, permanecen superficiales a la túnica albugínea primaria y constituyen la corteza ovárica (Narbaiz y De Robertis, 1970).

Al día 13 de incubación, las CGP's entran en profase meiótica. Las células de la teca y de la granulosa probablemente derivan de células somáticas corticales que rodean a las células germinales o de las células de la médula que migran hacia la corteza (Smith y Sinclair, 2004).

Alrededor del 14o día de incubación, los cordones sexuales secundarios se separan del resto del epitelio germinal por una segunda capa del tejido conectivo llamada túnica albugínea definitiva (Getty, 1982).

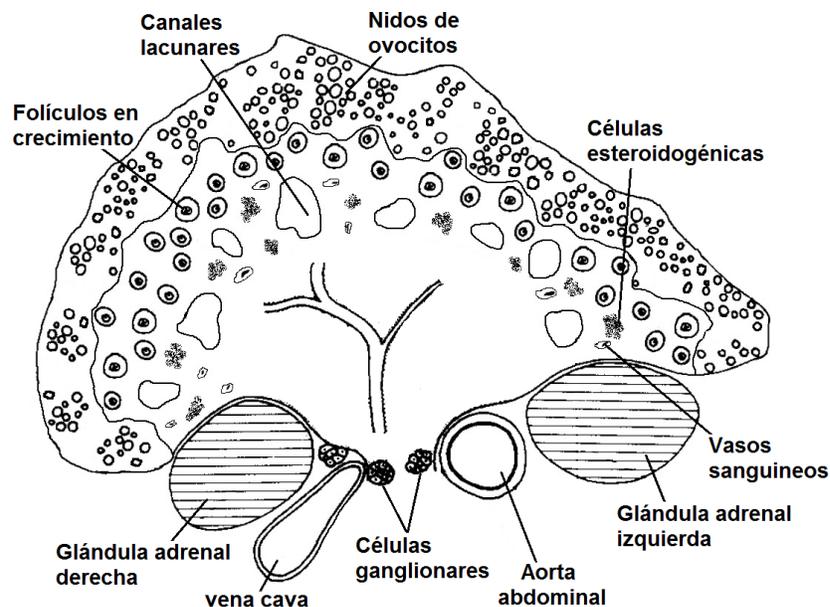
En el 17o día de incubación, la médula ovárica se encuentra formando un compartimento epitelial con cordones de células y espacios lacunares delimitados por células epiteliales (González del Pliego y col., 1988).

Al día 21 de desarrollo o día de eclosión, la corteza del ovario se encuentra recubierta por el epitelio superficial, el cual persiste hasta la madurez y está constituido por células cúbicas y tejido conectivo denso. La corteza, dentro de la cual están confinados las ovogonias y los ovocitos, rodea a la médula, la cual está formada por tejido conectivo, vasos sanguíneos, nervios y músculo liso (Getty, 1982; Gilbert, 1969).

La mayoría de las ovogonias se encuentran ahora en etapa de ovocitos primarios, los cuales están organizados en nidos o conglomerados. Entre los ovocitos se encuentran las células prefoliculares, las cuales comienzan a rodearlos para constituir la capa de la granulosa en el ovario adulto. Después del 2o día posteclosión, se empiezan a distinguir algunos folículos que contienen ovocitos y algo de tejido conectivo estromático que los delimita (Velázquez y col., 1991).

Se han definido en el ovario de pollo tres tipos de cordones esteroideogénicos importantes: las células esteroideogénicas típicas, las células poco diferenciadas y

las células de la granulosa que rodean al ovocito. Las células esteroideogénicas típicas, por una parte, pueden estar constituyendo cordones de tamaño variable y forma irregular. También se pueden localizar de manera aislada como células intersticiales. Se caracterizan por presentar numerosas mitocondrias con crestas tubulares en su citoplasma, sistemas de retículo endoplásmico liso y gran cantidad de gotas lipídicas. Las células poco diferenciadas se encuentran formando nidos o islotes pequeños y están delimitadas por una membrana basal que las compartimentaliza (Fig. 5) (González del Pliego y col., 1988).



**Fig. 5. Esquema que muestra la sección horizontal de un ovario de pollo posteclosión (modificado de Unsicker, 1983).**

Entre la 2a y 5a semana después de la eclosión, aparecen surcos en la superficie de la corteza. El número de surcos alcanzan su máximo a la 5a semana posteclosión y se hacen más profundos. Entre la 3a y 6a semana posteclosión, el ovario de pollo contiene muchos folículos en crecimiento, que a pesar de ser inmaduros, son una fuente importante de esteroides sexuales. La mayor parte de estos folículos sufren atresia masiva, característica del ovario de pollo inmaduro. El ovario aumenta de tamaño lentamente desde la eclosión hasta la edad de 4 meses (Fig. 6) (Van Nassauw y col., 1994).

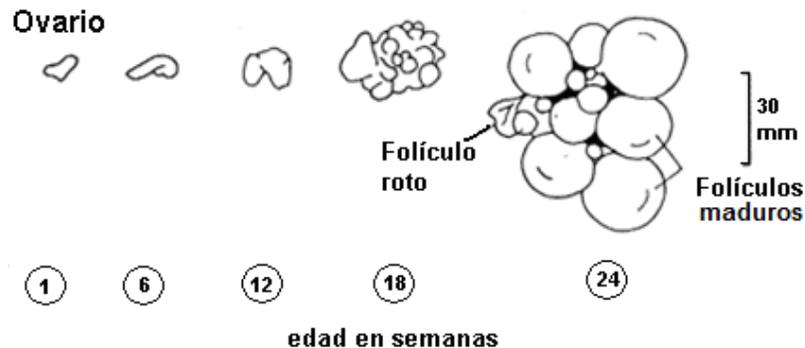


Fig. 6. Desarrollo del ovario de pollo (Modificado de Gilbert, 1969)

Con la aparición de la actividad sexual, la delimitación entre corteza y médula virtualmente se pierde. No obstante es posible reconocer después las zonas irregulares que contienen muchos folículos inmaduros, maduros y otras zonas características de la corteza en el ovario del animal adulto. También es posible distinguir otras zonas irregulares que contienen vasos sanguíneos, nervios y músculo liso; estas forman la zona vascular (médula) (Getty, 1982).

- **Ovogénesis**

Después del 11o día de incubación, la ovogénesis se efectúa en tres fases distintas:

1.- La fase de multiplicación, donde se produce una rápida proliferación de las ovogonias. Este estadio se completa en el momento de la eclosión (Getty, 1982).

2.- La fase de crecimiento, que inicia durante la eclosión. Se caracteriza porque se detiene la multiplicación, inicia el crecimiento de las células sexuales y se forman los ovocitos primarios. Cada uno tiene de 0.01 a 0.02 mm de diámetro y está incluido en un folículo primordial. Cuando inicia la actividad sexual de la hembra, el ovocito primario que iniciará su maduración, tiene un crecimiento lento y



sostenido hasta que alcanza el tamaño de 1mm de diámetro. Posterior a este aumento, se acumula el vitelo en el citoplasma del ovocito y como consecuencia aumenta su tamaño. El periodo final de crecimiento, en el que el ovocito pasa de 6 a 40 mm de diámetro, se efectúa a los seis días después de la eclosión; este es el periodo conocido como de máximo crecimiento. El peso final de ovocito primario es de 18 a 20 g. Por tanto, es una célula muy grande (Getty, 1982).

3.- La fase de maduración. Inicia en el folículo y se completa en el oviducto. Comprende dos divisiones sucesivas y desiguales. En la primera división se reduce el número de cromosomas, se forma un ovocito secundario y el primer corpúsculo polar; esto se completa mientras la célula se encuentra aun en el interior del folículo, dos horas antes de la ovulación. La segunda división de maduración y el desprendimiento del segundo corpúsculo polar se completan en el oviducto, después de la ovulación y fecundación (Getty, 1982).

Cada día otro folículo inicia un rápido crecimiento, de manera que antes de la primera ovulación, usualmente de 4 a 6 folículos pasan a la fase de rápido crecimiento, que se manifiesta por una jerarquía de tamaños, mientras que otros entran en atresia. Después de la primera ovulación, cuando el folículo es de casi 40 mm de diámetro, un nuevo folículo es reclutado y esto se repite después de cada ovulación (Sturkie y Poorvin, 1973).

- **Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada**

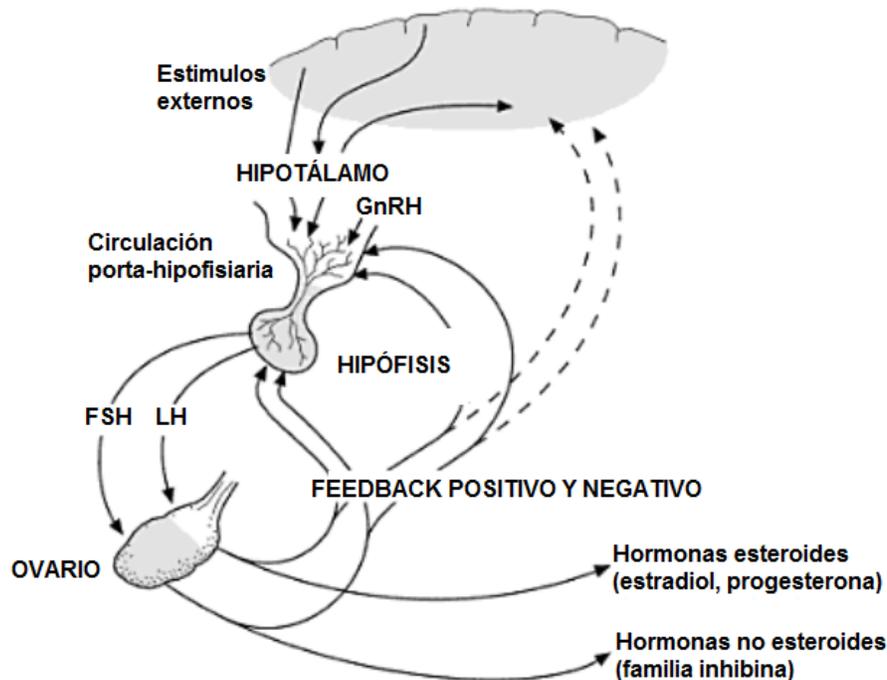
En el ovario en desarrollo, se ha demostrado la presencia temprana de los esteroides gonadales, andrógenos y estrógenos (Nishikimi y col., 2000; Villalpando y col., 2000; Yoshida y col., 1996); de los péptidos inhibina, activina y folistatina (Bruggeman y col., 2002; Ottinger, 1989) y en la hipófisis de las gonadotropinas: hormona luteinizante (LH) y estimulante de los folículos (FSH) (Maseki y col., 2004; Puebla y col., 2002).



En las aves, el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (H-H-G) se establece a partir de los 13.5 días del desarrollo embrionario (Woods y Thommes, 1984). Las gonadotropinas son producidas en grupos celulares conocidos como gonadotropos, presentes tanto en la región cefálica como en la caudal de la adenohipófisis. El inicio de la diferenciación de estos grupos celulares se ha descrito a los 8 días de incubación (Maseki y col., 2004). Se ha demostrado que durante la embriogénesis de las aves, la síntesis de FSH y LH ocurre en los gonadotropos específicos para cada hormona a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, en los cuales se observa que un mismo gonadotropo sintetiza ambas gonadotropinas (Maseki y col., 2004; Puebla y col., 2002).

La señal para la síntesis y secreción de la FSH y LH en la hipófisis es regulada por la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) que se encuentra en el hipotálamo. Esta hormona viaja por el sistema hipotálamo-hipofisiario, llega a la hipófisis anterior y se une a su receptor en los gonadotropos (Stojilkovic y col., 1988). La secreción de la FSH o LH por los gonadotropos, depende de la frecuencia y amplitud de los pulsos de secreción de la GnRH. En mamíferos, los pulsos de altas frecuencias de liberación de GnRH estimulan preferentemente la secreción de LH, mientras que los de baja frecuencia favorecen la producción de FSH (Fig. 7) (Recabarren y col., 2006).

Las gonadotropinas al actuar en el ovario, favorecen el crecimiento folicular y la esteroidogénesis, lo que se traduce en el incremento en la secreción principalmente de estrógenos, andrógenos y progesterona ( $P_4$ ). En aves, los estrógenos son sintetizados por las células intersticiales de la teca externa. Los andrógenos, tienen un doble origen, ya sea de las células intersticiales del estroma o de la teca interna (Rodríguez y col., 1996). La  $P_4$  se produce en mayor proporción en las células de la granulosa del folículo preovulatorio y postovulatorio (Sauveur, 1992).



**Fig. 7. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), Hormona luteinizante (LH) y Estimulante de los folículos (FSH), Feedback (retroalimentación). (Tomada y modificada de Balen, 2007)**

La progesterona, testosterona y el  $17\beta$ -estradiol son producidos en el embrión de pollo después de los 6-7 días de incubación y aparecen en el plasma hasta los 7.5 días de vida embrionaria, lo cual es una evidencia de que estos esteroides son secretados en los primeros estadios del desarrollo de la gónada. En cultivos de células y órganos del embrión de pollo, el ovario produce  $17\beta$ -estradiol y estrona. Por estudios de Inmunohistoquímica se han identificado, en las gónadas de embriones de pollo, las enzimas relacionadas con la esteroidogénesis. Asimismo, se ha demostrado que en el pollo recién eclosionado, existen dos subpoblaciones de células ováricas involucradas en la secreción de esteroides: las típicas células esteroidogénicas, que secretan esteroides y las células poco diferenciadas, encargadas de la secreción de  $17\beta$ -estradiol (Gómez y col., 2001; Pedernera y col., 1988).



- **Inervación del ovario de aves**

Las funciones ováricas se encuentran bajo el control hormonal y por la inervación que llega a las gónadas (Burden y col., 1985).

El ovario de pollo es inervado por el plexo ovárico, que se asienta dorsalmente a lo largo de la porción hiliar y se localiza ventralmente a la aorta. Presenta abundantes haces nerviosos que se extienden a lo largo de esta zona y hacia las glándulas adrenales y el riñón; en su trayecto se ubican ganglios, en los que se encuentran numerosos somas neuronales. El plexo ovárico recibe ramas simpáticas de los ganglios torácicos V, VI y VII, además de los ganglios lumbosacros simpáticos I y II. El nervio vago es otra fuente de inervación del ovario (Aguirre-Benítez, 2009). El sistema nervioso parasimpático inerva al ovario izquierdo con fibras preganglionares colinérgicas y adrenérgicas, que surgen de los plexos prevertebrales y pelvianos y penetran a la médula ovárica por el hilio, formando una extensa red de fibras nerviosas adrenérgicas, que inervan a los folículos, cordones esteroideogénicos y a la musculatura lisa de los vasos sanguíneos. En el hilio ovárico, se encuentran algunos ganglios originados a partir del plexo ovárico (Gilbert, 1965).

Se ha reportado inervación extrínseca, principalmente catecolaminérgica, que hace contacto con los cordones de células esteroideogénicas del intersticio. La inervación en el ovario de las aves se ha identificado alrededor de los 11 días de incubación. Los tractos nerviosos que provienen del sistema nervioso periférico: simpático y parasimpático, penetran al hilio ovárico y se ramifican hacia la médula ovárica (Ávila y col., 1987 a y b; Ávila y col., 1989; Ávila y col., 1991).

Gilbert (1965), identificó diez o más nervios que consistían de 50 a 100 fibras individuales, que desembocan en el tallo folicular. Estas fibras penetran en la teca interna y están asociadas con el músculo liso y vasos sanguíneos. La granulosa



recibe muy poca inervación (Bahr y col., 1974). En cambio, la teca interna de los folículos pequeños y en crecimiento, así como el estroma del ovario, recibe abundante inervación (Dahl, 1970).

En las fibras nerviosas que inervan el ovario de diferentes especies, se han identificado neuropéptidos como sustancia P (SP), el neuropéptido Y (NPY) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), entre otros. Estas fibras se encuentran asociadas a la teca externa de los folículos antrales, al tejido intersticial y a los vasos sanguíneos (Dees y col., 1995; Hulshof y col., 1994). También se han localizado fibras dopaminérgicas, adrenérgicas y noradrenérgicas (Bahr y col., 1974; Ebeid y col., 2008; Greiner y col.; 2008), así como los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos y dopaminérgicos en las células esteroideogénicas, luteales y de la granulosa (Holmgren y Jensen, 2001; Rey-Ares y col., 2007).

Müller (1988) demostró que en el desarrollo embrionario del ovario del pollo, además de estar regulado por la acción de las hormonas esteroideas, intervienen otros factores en su diferenciación, como los neurotransmisores liberados en el ovario por las diferentes fibras que lo inervan.

- **Neuropéptidos**

Lo neuropéptidos son sustancias neuroactivas que consisten de una cadena corta de aminoácidos (Gómez y col., 2008). Sus receptores en las células blanco se encuentran acoplados a las proteína G y se conocen como metabotrópicos (Emson y Lindvall, 1979; Krieger, 1986). Estos neuropéptidos actúan en neuronas y tejidos no neurales, por lo que se encuentran implicados en la regulación de diversas funciones, tales como: la reproducción, el crecimiento, control de temperatura, la ingesta del alimento y agua, control cardiovascular, gastrointestinal y respiratorio, en la conducta y memoria (tablas 1 y 2) (Strand., 1999).



Tabla 1. Efectos de los neuropéptidos en la regulación de diferentes funciones

Función	Circulación	Sistema Nervioso y Conducta	Digestión	Embarazo y parto	Metabolismo	Sistema Inmune	Funciones Ováricas
Vasopresina	x	x					
Tiroliberina	x	x	x		x	x	
Substancia P	x	x	x				x
Somatotoprina	x	x	x			x	
Somatostatina		x	x		x	x	
Prolactina		x		x	x		
VIP	x	x	x	x		x	x
ANP	x	x					
Oxitocina		x		x			
Neurotensina	x	x	x	x	x		
Neuropéptido Y	x	x	x	x		x	x
Glucagón		x	x		x		
Gastrina			x				
Endorfinas	x	x	x		x	x	
Enkefalinas	x	x	x		x	x	
Dinorfina		x				x	
Bradiquinina	x						
Angiotensina II	x	x					
ACTH	x	x			x	x	

(Modificado de Aréchiga, (1991). Abreviaturas: ACTH: hormona adrenocorticotropa. ANP: Péptido Natriurético Auricular. VIP: Péptido Intestinal Vasoactivo.)



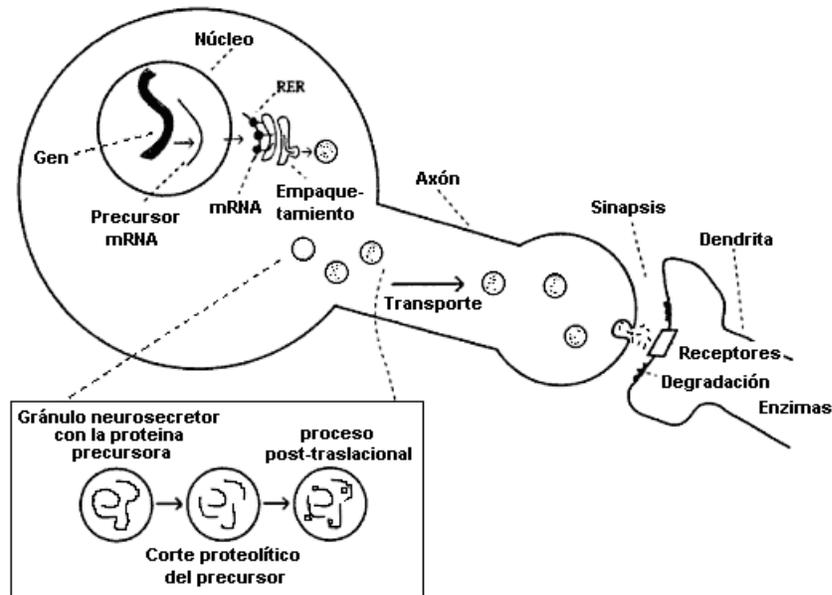
Tabla 2. Efectos de neuropéptidos sobre el sistema nervioso y la conducta en vertebrados.

Funciónes	Sensibilida d al dolor	Integración motora	Memoria y aprendizaje	Conducta reproductiva	Alimentación	Emociones
Vasopresina	x		x			
Tiroliberina	x	x	x		x	
Substancia P	x	x	x	x	x	
Somatotoprina			x			
Somatostatina	x	x	x			
Prolactina				x	x	
VIP	x			x		
ANP						
Oxitocina	x		x	x		
Neurotensina	x	x				
Neuropéptido Y				x	x	
Endorfinas	x	x	x	x	x	x
Enkefalinas	x	x		x	x	x
Dinorfina	x	x			x	
Angiotensina II	x				x	
ACTH	x	x	x			

(Modificado de Aréchiga, (1991). Abreviaturas: ACTH: hormona adrenocorticotropa. ANP: Péptido Natriurético Auricular. VIP: Péptido Intestinal Vasoactivo).

La síntesis de neuropéptidos es un proceso complejo y distinto de los neurotransmisores. Prácticamente todos los neuropéptidos son parte de una molécula precursora inactiva de mayor tamaño, que después de ser sintetizada en el retículo endoplásmico, se traslada al aparato de Golgi para su empaquetamiento, seguida de su transporte y liberación por exocitosis. En las vesículas o gránulos secretores, las proteínas precursoras son almacenadas junto con enzimas de procesamiento, las convertasas, cuya función es liberar a los péptidos bioactivos (Hökfelt y col., 2000).

Los neuropéptidos son degradados en el espacio extracelular por peptidasas (Fig. 8) (Hökfelt y col., 2000). Por tanto, no son recapturados o reciclados por la neurona y la cantidad de péptidos que se liberan depende del almacén de sus proteínas precursoras ([http://www. biopsicologia.net/nivel3participacion-plastica-y-funcional/2.neuropeptidos.html](http://www.biopsicologia.net/nivel3participacion-plastica-y-funcional/2.neuropeptidos.html)).



**Fig. 8 Biosíntesis, procesamiento, transporte, y secreción de neuropéptidos en la neurona.** Este esquema muestra los estadios progresivos de la síntesis de neuropéptidos en las neuronas neuropeptídicas. El recuadro representa las tres etapas del proceso post-traduccion del neuropéptido que ocurren durante el transporte axonal de los gránulos neurosecretorios: embalaje, la escisión proteolítica, y la modificación (por ejemplo, amidación, glicosilación, fosforilación, etc.) (Modificado de Strand 1999).

- **Neuropéptido Y (NPY)**

El NPY es una molécula de 36 aminoácidos que forma parte de la familia de los polipéptidos pancreáticos. Fue purificado por primera vez en el cerebro porcino (Dumont y col., 1992; Gil, 2010). Su nombre deriva del residuo de tirosina (Y) en su NH<sub>2</sub> y COOH terminal. Su secuencia se ha mantenido con pocos cambios a lo largo de la evolución de las especies ya que solo hay un aminoácido de diferencia



entre humano y pollo y cuatro sustituciones de aminoácidos entre humano y el pez (Fig. 9) (Lundell y col., 2002).

Secuencias de aminoácidos de NPY

Péptidos	Posición del aminoácido							
	1	5	10	15	20	25	30	35
NPY porcino	Y-P-S-K-P-D-N-P-G-E-D-A-P-A-E-D-L-A-R-Y-Y-S-A-L-R-H-Y-I-N-L-I-T-R-Q-R-Y-NH <sub>2</sub>							
NPY rata	Y-P-S-K-P-D-N-P-G-E-D-A-P-A-E-D-M-A-R-Y-Y-S-A-L-R-H-Y-I-N-L-I-T-R-Q-R-Y-NH <sub>2</sub>							
NPY humano	Y-P-S-K-P-D-N-P-G-E-D-A-P-A-E-D-M-A-R-Y-Y-S-A-L-R-H-Y-I-N-L-I-T-R-Q-R-Y-NH <sub>2</sub>							
NPY pollo	Y-P-S-K-P-D-S-P-G-E-D-A-P-A-E-D-M-A-R-Y-Y-S-A-L-R-H-Y-I-N-L-I-T-R-Q-R-Y-NH <sub>2</sub>							
NPY pez zebra	Y-P-I-K-P-D-N-P-G-E-G-A-P-A-E-E-L-A-K-Y-Y-S-A-L-R-H-Y-I-N-L-I-T-R-Q-R-Y-NH <sub>2</sub>							
NPY rana	Y-P-S-K-P-D-N-P-G-E-D-A-P-A-E-D-M-A-K-Y-Y-S-A-L-R-H-Y-I-N-L-I-T-R-Q-R-Y-NH <sub>2</sub>							

Fig. 9. Se muestra la secuencia de aminoácidos de diferentes especies. El aminoácido diferente se encuentra subrayado (modificada de Blomqvist y col., (1992)

El NPY proviene de un péptido precursor (prepro-NPY) que, tras sucesivas degradaciones, se transforma en NPY (Serra, 2006). Una gran variedad de moléculas y cascadas intracelulares son capaces de modular la síntesis de NPY. Se han descrito agentes que estimulan o inhiben el proceso. Como estimuladores están las hormonas esteroides, algunos neurotransmisores, factores de crecimiento entre otros (Magni y col., 2001). Como agente inhibidor destaca la leptina (hormona secretada por el tejido adiposo) (Zhang y col., 1997).

El NPY se libera de los nervios simpáticos, preferentemente bajo condiciones de intensa actividad neuronal. La estimulación simpática prolongada disminuye el contenido de NPY en las fibras simpáticas y, debido al lento transporte axonal del NPY, puede tomar hasta 11 días volver a sintetizar el NPY en las terminales nerviosas (Zukowska y col., 2003).

Posee una variedad de efectos fisiológicos que incluyen: incremento en la alimentación, balance energético e inhibición del comportamiento reproductivo. En la periferia NPY causa vasoconstricción, regula la presión sanguínea y aumenta la actividad de noradrenalina y adrenalina en las terminales sinápticas (Manríquez 2010).

El NPY participa en la modulación de la secreción de la GnRH, sin embargo los resultados generados al respecto son contradictorios, debido a que se le atribuyen



efectos estimulantes o inhibitorios. Estos efectos diferenciales del NPY pueden ser el reflejo de los modelos de experimentación tan diversos que se utilizan y que involucra la especie, el sexo y la edad del animal de experimentación, así como el tiempo de exposición a los agonistas o antagonistas de este neuropéptido (Tur y col., 2010).

Los efectos del NPY son el resultado de la unión con sus receptores, de los cuales en mamíferos, se han clonado 6 subtipos que pertenecen a la familia de los receptores de membrana acoplados a la proteína G (Pedrazzini y col., 2003; Sokolowski, 2003), estos receptores se identifican con la letra Y seguida de un número: Y-1, Y-2, Y-4, Y-5, Y-6 y Y-7 (Yanagisawa y LeRoith, 2007)

• Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP)

El VIP es una molécula de 28 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 3326 g/mol (Henning y Sawmiller, 2001; Kowalewski y col., 2010). Su secuencia de aminoácidos está altamente conservada entre muchas especies de vertebrados (Fig. 10) (Esposito y col., 1994).

Péptido	Secuencia de aminoácidos
<b>VIP</b>	
Humano	HSDAV FTDNY TRLRK QMAVK KYLNS ILN
Puerco de Guinea	----L ---T- ----- ---M- ----- V--
Zarigüeya	----- ---S- ---L- ---MR ---D- ---
Pollo	----- ----- S-F-- ----- ----- V-T
Caimán	----- ----- S-F-- ----- ----- V-T
Rana	----- ----- S-F-- ----- ----- V-T
Trucha	----I ----- S-F-- ----- ----- V-T
Bacalao	----- ----- S-F-- ---A- ----- V-A

Fig. 10. Secuencia de aminoácidos del VIP de diferentes especies de vertebrados (modificado de Holmgren y Jensen, 2001).



En 1970, Sami Said y Víctor Mutt aislaron e identificaron el VIP en el intestino del porcino gracias a su capacidad de aumentar el flujo sanguíneo y disminuir la presión arterial. Su nombre deriva de la relajación que ocasiona en el músculo liso gastrointestinal (Henning y Sawmiller, 2001). Mutt y Said (1974) establecieron la secuencia de aminoácidos de VIP y poco después la síntesis del péptido.

El VIP está presente en el sistema nervioso central y periférico donde funciona como neuromodulador. Se encuentran altas concentraciones de este neuropéptido en el tracto intestinal, el corazón, los pulmones, vejiga, glándula tiroides, riñones, aparato reproductor y el cerebro (Henning y Sawmiller, 2001).

En el sistema nervioso periférico, VIP está presente en los ganglios simpáticos, el nervio vago, algunos nervios motores como el nervio ciático, los nervios autónomos que inervan las glándulas exocrinas, músculo liso vascular y no vascular, y en agrupaciones de cuerpos celulares neuronales que proporcionan inervación "intrínseca" a los órganos (Fahrenkrug, 1989; Henning y Sawmiller 2001)

En las aves, el VIP es secretado por neuronas que se localizan en la zona mediobasal del hipotálamo. Estas neuronas se proyectan de la capa externa de la eminencia media donde secretan el VIP al sistema portal hipotalámico-hipofisario y posteriormente a la adenohipófisis, donde actúa en los receptores de membrana de las células lactotropas y estimula la secreción de prolactina (Bhatt y col., 2003).

En el tracto genital femenino, se han localizado nervios inmunoreactivos para VIP asociados a vasos sanguíneos que irrigan el músculo liso y el útero, así como el estroma ovárico (Larsson y col., 1977). Además, tiene efectos vasodilatadores y de mantenimiento de la quiescencia uterina durante la gestación por su acción sobre el músculo liso vascular (Ekesbo y col., 1991).

El VIP, además de actuar en el hipotálamo, en el ovario se le asocia con la regulación de la secreción de estradiol y progesterona, debido a que cuando se mantienen en cultivo células de la granulosa de rata, aumenta la secreción de



esteroides, efecto que depende de la dosis de VIP. La estimulación que ejerce el VIP en la producción de estrógenos se le asocia con el incremento de la actividad de la aromatasa. Estos resultados indican que VIP es un regulador de la actividad ovárica (Davoren y Hsueh, 1985).

- **Catecolaminas**

Además de los neuropéptidos, las catecolaminas participan en la modulación de actividades reproductivas (Spicer. 1986; Mayerhofer y col., 1998; López y col., 2010). Las catecolaminas son sustancias producidas en el cerebro a partir de un mismo aminoácido, la L-tirosina y son compuestos formados por un núcleo catecol (un anillo de benceno con dos hidroxilos) y una cadena de etilamina o alguno de sus derivados. Las principales catecolaminas son: dopamina, adrenalina (epinefrina) y noradrenalina (norepinefrina) y estas sustancias actúan como mensajeros químicos en el sistema nervioso. Participan en diversas funciones, como la regulación neuroendocrina, la actividad motora, la efectividad, la ingesta de agua y alimento entre otras (Hernández, 2002).

En el ovario de mamíferos, las catecolaminas, principalmente la noradrenalina, están involucradas en la modulación de diferentes aspectos de las funciones ováricas, como el crecimiento folicular, la esteroidogénesis y en estados patológicos como el síndrome de ovario poliquístico (Greiner y col., 2008).



Tabla 3. Participación de las catecolaminas en la regulación de diferentes funciones.

Catecolamina	Lugar de producción	Función	Referencia
<b>Adrenalina</b>	-Fibras nerviosas -Hipotálamo -Ovario	-Estimulación de la liberación de LH. -Estimulación del crecimiento folicular. -Estimulación de la ovulación.	-Bahr y col., 1974 -Ebeid y col., 2008 -Li y col., 1994
<b>Noradrenalina</b>	-Fibras nerviosas -Hipotálamo -Ovario -Células de la teca y granulosa	-Liberación de GnRH. -Estimula la producción de progesterona y andrógenos.	- Bahr y col., 1974 -Greiner y col., 2008 -Li y col., 1994
<b>Dopamina</b>	-Cerebro -Ovario	-Procesos cognitivos, motores y endocrinos. -Inhibe la liberación de GnRH. -Estimula la liberación de GnIH.	-Lévesque y col., 1992 -Tinikul y col., 2009

La tiroxina hidroxilasa (TH) es la primera enzima y la limitante en síntesis de las catecolaminas (López y col, 2010). Cataliza la conversión de tirosina en dihidroxifenilalanina (DOPA), la ácido aromático-L amino descarboxilasa cataliza la descarboxilación de DOPA a dopamina. La dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, a su vez, cataliza la  $\beta$ -hidroxilación de la cadena lateral de la dopamina para formar noradrenalina. Finalmente, la feniletanolamina N-metiltransferasa cataliza la N-metilación de noradrenalina a adrenalina (Fig. 11) (Vélez y col., 2004)

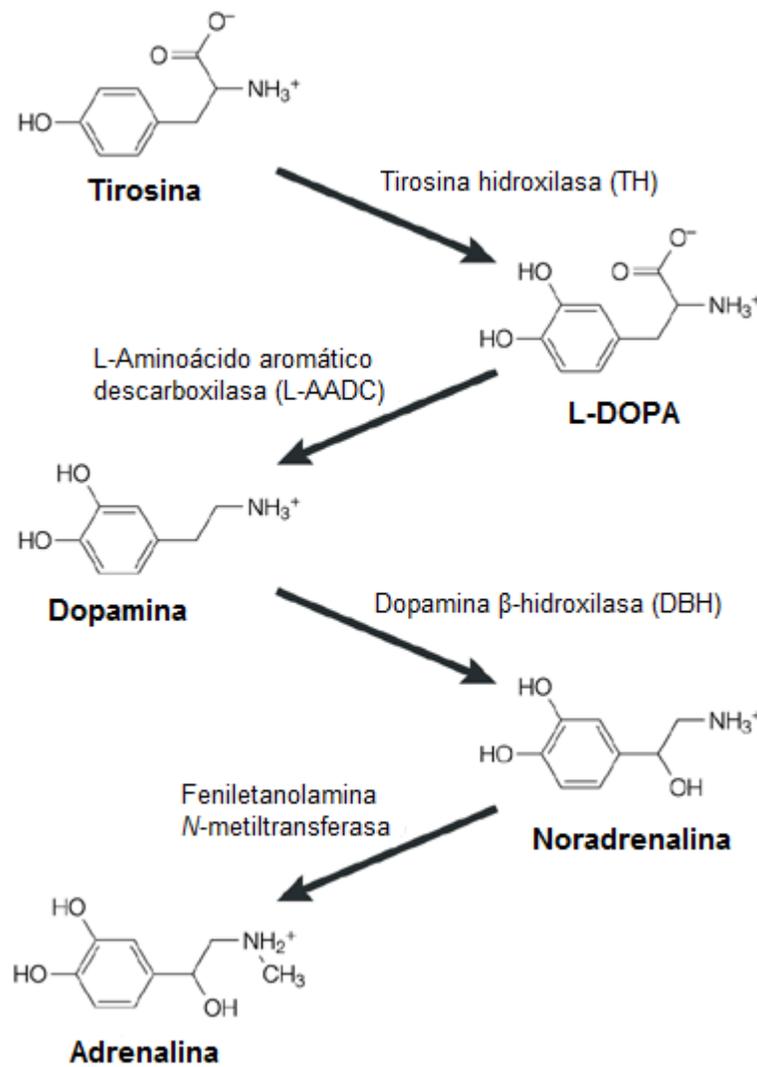


Fig. 11. Síntesis de las catecolaminas. (DOPA) dihidroxifenilalanina (Tomada y modificada de Goridis y Rohrer, 2002).

Las catecolaminas se almacenan en los gránulos cromafines de la médula adrenal y en las terminaciones nerviosas simpáticas. El principal estímulo fisiológico para su liberación es la acetilcolina originada en las terminaciones nerviosas simpáticas preganglionares. Esta se une a receptores nicotínicos causando despolarización de las células cromafines y aumento de su permeabilidad al calcio, con la consecuente exocitosis de las catecolaminas (Vélez y col., 2004).



El efecto biológico de las catecolaminas es muy corto debido a su captación por las terminaciones simpáticas, conversión a metabolitos inactivos o excreción renal (Vélez y col., 2004)

Se han utilizado diferentes moléculas como marcadores neuronales, entre ellos se encuentra la enolasa específica de neurona gama (NSE), que es considerada como un marcador citoplasmático de neuronas y células neuroendocrinas (Kimaro y Madekurozwa, 2006). La enzima enolasa (2-fosfo-D-glicerato hidrolasa) es una metaloenzima que participa en la segunda mitad de la vía glucolítica. En los vertebrados hay tres isoenzimas diferentes: la  $\alpha$ -enolasa que se encuentra en la mayoría de los tejidos; la  $\beta$ -enolasa, que se encuentra casi exclusivamente en tejido muscular y la  $\gamma$ -enolasa se encuentra en las neuronas y tejidos neuroendocrinos (Sundblad y col., 2006). En este trabajo se utilizó la NSE para mostrar la distribución de la red nerviosa ovárica en el pollo.

## **IDENTIFICACIÓN DE LOS NEUROPEPTIDOS Y LAS CATECOLAMINAS EN EL OVARIO Y SU PARTICIPACIÓN EN LAS FUNCIONES OVARICAS.**

Diferentes grupos de trabajo han estudiado la participación de los neuropéptidos y las catecolaminas en la regulación de los procesos reproductivos y en el desarrollo gonadal en mamíferos (Burden, 1978; Burden y col., 1983; Johnson y col., 1994; Ojeda y col., 1985). Se les asocia con la modulación del desarrollo folicular, el flujo sanguíneo, la respuesta de las células foliculares a la acción de las gonadotropinas y la secreción de hormonas esteroideas sexuales como la progesterona y los estrógenos, hormonas que al actuar en diferentes regiones del cerebro modulan la conducta reproductiva de la hembras (Alm y col., 1980; Hulshof y col., 1994; Palle y col., 1991).

Por técnicas de inmunohistoquímica se han identificado VIP y NPY en fibras nerviosas, distribuidas alrededor de los vasos sanguíneos, en la pared folicular y



en la glándula intersticial en el ovario de rata, cerdo y humano, así como en las capas musculares lisas y subepiteliales del oviducto (Kannisto y col., 1986).

### **Aves**

En las aves, se ha reportado que VIP se encuentra distribuido en la gónada y se propone que tiene una participación en la actividad reproductiva y el desarrollo gonadal (Aguirre-Benítez y col., 2005 a y b). En la gallina, el VIP se localiza en fibras nerviosas que inervan los folículos preovulatorios y se sugiere que participa en la activación del plasminógeno y en el control de la diferenciación celular y el desarrollo del ovario (Johnson y Tilly, 1988).

En gallinas, se examinó el papel de las catecolaminas en función de los ovarios. Se determinó la ubicación de las catecolaminas en el folículo preovulatorio de la gallina doméstica y además, se midieron noradrenalina, adrenalina y dopamina en la capa de teca de los cinco folículos preovulatorios mayores en momentos específicos durante el ciclo ovulatorio y los cambios en el contenido de catecolaminas fueron correlacionados con los eventos del ovario. Los resultados indicaron que las catecolaminas se encuentran principalmente en la capa de la teca del folículo preovulatorio de la gallina doméstica, que la noradrenalina es la principal catecolamina y que la elevación de adrenalina y noradrenalina 6 horas antes de la ovulación, sugiere que las catecolaminas pueden tener algún papel en el proceso ovulatorio de la gallina doméstica (Bahr y col., 1986).

Experimentos en gallina, donde se inyectó adrenalina y noradrenalina vía intramuscular, revelaron que los ovarios de los animales tratados con catecolaminas tenían un mayor desarrollo y contenían más folículos de la línea amarilla. Por lo tanto, la adrenalina y noradrenalina aumentan la tasa de ovulación y las concentraciones de 17- $\beta$  estradiol, P<sub>4</sub>, zinc y triglicéridos comparados con los animales control, lo que concluye que las catecolaminas juegan un papel en el desarrollo folicular ovárico y en la ovulación de las gallinas (Ebeid y col., 2008).



### **Bovino**

En el ovario de bovino, el VIP se encuentra ausente en los ovarios de fetos de 3-4.5 meses de gestación, y en pocos sitios de la corteza ovárica en fetos de 4.5-6 días de gestación. Esta reacción positiva a VIP aumenta con la edad. Hasta los nueve meses de gestación la inmunoreactividad para VIP estaba limitada a la corteza y a partir de este momento también se observó en la medula ovárica. (Hulshof y col., 1994). Después del nacimiento, el VIP se encuentra en fibras nerviosas del estroma ovárico, cerca de folículos preantrales, en el tejido intersticial, alrededor de los vasos sanguíneos y en la teca externa de los folículos antrales (Hulshof y col., 1994; Kannisto y col., 1986). En relación a su participación en la modulación de las funciones del ovario, el VIP se incrementa en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios de bovino, cuando se produce el pico preovulatorio de la LH. Este hecho permitió pensar que el VIP cumple una función en la ovulación (Hulshof y col., 1994).

El NPY estaba ausente en los ovarios de fetos de 3-4.5 meses de gestación y a partir de los 4.5-6 meses de gestación fibras positivas para NPY aparecieron en la túnica adventicia de arterias distribuidas en la médula ovárica. Estas fibras positivas a NPY aumentaron hasta los 9 meses de gestación y después de ese momento también se observaron fibras inmunoreactivas para NPY en el estroma cerca de folículos preantrales y en la teca externa de los folículos antrales (Hulshof y col., 1994).

### **Ovino**

En ovario de ovino, el NPY se encuentra en las células de la teca y de la granulosa que conforman los folículos y cuerpo lúteo, en las fibras nerviosas del estroma ovárico, y en los vasos del hilio ovárico. En el cuerpo lúteo, se localiza principalmente en los pericitos y células endoteliales de los vasos sanguíneos, que se encuentra dispersa por todo el cuerpo lúteo y dentro de la cápsula lútea. Estos resultados sugieren que el NPY actúa en el sistema vascular del cuerpo lúteo, en



donde posiblemente estimula el flujo sanguíneo y la secreción de oxitocina respectivamente, lo cual en conjunto, implica un papel durante el proceso de luteólisis (Keator y col., 2010).

### **Porcino**

En porcinos, se identifican dos tipos de poblaciones de fibras nerviosas inmunoreactivas para NPY, que se originan en el ganglio mesentérico inferior: Una de estas es también positiva para TH e inerva la vasculatura ovárica. La segunda es solo inmunoreactiva para NPY y se encuentra asociada con los folículos en crecimiento. Una tercera población de fibras nerviosas negativas para NPY, pero positiva para TH y para dopamina-beta-hidroxilasa, inervan los vasos sanguíneos y en menor medida los folículos ováricos (Majewski y Heym, 1991).

Cuando se mantiene *in vitro* el ovario porcino y se le adiciona al medio NPY, se inhibe la producción de progesterona, lo que sugiere un efecto inhibitorio en la secreción de esta hormona (Pitzel y col., 1991).

Realizando neurectomías del plexo y de los nervios ováricos superiores en ovarios porcinos, se observó una reducción dramática de las terminaciones nerviosas inmunoreactivas para dopamina-beta-hidroxilasa y/o TH. Estos resultados revelaron que la denervación de los ovarios durante la fase media lútea del ciclo estral en las hembras, causa distintos cambios en la morfología y la actividad androgénica del órgano, lo que confirma un papel importante del sistema nervioso periférico en el control de la gónada de porcinos (Jana y col., 2007).

### **Rata**

En el ovario inmaduro de rata, el VIP fue ubicado en fibras nerviosas localizadas alrededor de venas, en el tejido intersticial y asociado con las capas tecales de los folículos en desarrollo (Ahmed y col., 1986). En el ovario de rata madura, se observó un escaso número de fibras nerviosas inmunoreactivas para VIP en el



tejido intersticial. Estas fibras estaban próximas al endotelio de los vasos sanguíneos, así como a la teca externa de los folículos (Kannisto y col., 1986)

En la etapa neonatal de rata, el VIP favorece en el ovario la expresión de los receptores a FSH y la síntesis del ARNm de la aromatasa (Mayerhofer y col., 1997). En la etapa adulta, participa en la modulación de la esteroidogénesis favoreciendo la síntesis de progesterona, andrógenos y estrógenos; estos últimos aumentan considerablemente en el día del proestro (Ahmed y col., 1986; Jorgensen y col., 1989; Moshin y Pennefather, 1979).

En el ovario de la rata existe una red de fibras NPYérgicas alrededor de los vasos sanguíneos, en el tejido intersticial y entre los folículos (McDonald y col., 1987).

Cuando los ovarios de ratas adultas en Diestro-1 y Diestro-2, se mantiene *in vitro* y se le agrega al medio los neuropéptidos NPY y VIP, ya sea solos o en combinación con noradrenalina, La secreción de progesterona disminuye en el día del Diestro-1, mientras que en el Diestro-2 aumenta. En ambos casos, los efectos se potenciaron cuando se combinaron los neuropéptidos con norepinefrina. Estos resultados apoyan la idea de que los neuropéptidos participan en la regulación de la esteroidogénesis (Garraza y col., 2004).

Al realizar la técnica de doble marcaje, se observa una coexistencia entre NPY y la dopamina-beta-hidroxilasa (DBH), lo que sugiere que este neuropéptido se almacena en los nervios simpáticos noradrenérgicos. Esto se comprobó cuando en la rata se realizó una denervación simpática y se observó que se elimina la DBH y la inmunoreactividad para NPY en el ovario (Kannisto y col., 1986).

En relación a las catecolaminas, en el ovario de rata se encuentran fibras nerviosas noradrenérgicas inmunoreactivas para la tirosina en los folículos y vasos sanguíneos. Se sugirió que estos nervios catecolaminérgicos influyen en funciones como el transporte de los espermatozoides, los óvulos y el parto (Papka y col., 1985).



Para demostrar la participación de las catecolaminas en la esteroidogénesis, se realizaron estudios en rata, donde se determinó que la noradrenalina y en especial la epinefrina, actúan principalmente sobre los receptores B2 adrenérgicos presentes en la teca y en la capa granulosa y estimulan la liberación de progesterona y de andrógenos, pero no parecen incrementar la secreción de estradiol, por lo que se ha propuesto que el control intraovárico está regulado directamente por impulsos nerviosos provenientes de la liberación de catecolaminas, de tal forma se plantea que el control endocrino y neural intraovárico, están regulados por los estímulos tanto catecolaminérgicos como neuropeptidérgicos (Ojeda y col., 1986).

### ***Humano***

En el ovario de humano, se localizó una gran cantidad de fibras positivas para VIP en el estroma ovárico, cerca de los folículos y alrededor de los vasos sanguíneos (Kannisto y col., 1986).

En las gónadas de los fetos de 16-25 semanas, el NPY se expresa poco y sólo se ha identificado por radioinmunoensayo. En los fetos de 40 semanas de gestación, las fibras nerviosas se identifican en los vasos sanguíneos y en los folículos primordiales. También se ha identificado al NPY durante el desarrollo embrionario, lo que permite plantear que participa durante esta fase del desarrollo (Jorgensen y col., 1996).

Se demostró que NPY juega un papel en la esteroidogénesis directamente al actuar en las células de la granulosa de los folículos de humano en la fase temprana de la luteinización (Barreca y col., 1998).



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las funciones ováricas no solo son reguladas por las gonadotropinas y esteroides, sino también por las fibras nerviosas que llegan al ovario y ejercen un efecto modulador (Domínguez y col., 1981, Gerendai y col., 2005). En los mamíferos, a través de la inervación, llegan al ovario neuropéptidos y neurotransmisores como el VIP, NPY y las catecolaminas, los cuales modulan funciones ováricas como el desarrollo gonadal, la maduración folicular, la ovulación, la esteroidogénesis y el flujo sanguíneo (Barreca y col., 1998; Hulshof y col., 1994; Garraza y col., 2004; Moshin y Pennefather, 1979).

En el ovario de la gallina, se ha estudiado la función de las catecolaminas y del péptido intestinal vasoactivo, pero aún se requiere de más información para aclarar el papel de estas moléculas (Johnson y col., 1994; Kawashima y col., 1995; Ebeid y col., 2008). En el ovario del embrión y del pollo recién eclosionado hay muy poca información acerca de la presencia de las catecolaminas y el VIP (Aguirre-Benítez, 2009), mientras que sobre el NPY no se tiene información de su presencia en el ovario por lo que es de nuestro interés localizar el VIP, NPY y las catecolaminas en diferentes edades del desarrollo ovárico embrionario y posteclosión del pollo.



## **HIPÓTESIS**

Si en el ovario de mamíferos ya han sido identificados las catecolaminas y los neuropéptidos VIP y NPY, entonces es posible que se localicen en diferentes poblaciones celulares del ovario de pollo durante su desarrollo embrionario y después de la eclosión.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar las poblaciones celulares en las que se localizan los neuromoduladores: VIP, NPY y catecolaminas, en el ovario izquierdo de pollo, durante el desarrollo embrionario, al momento justo de la eclosión y después de la eclosión.

### **❖ Objetivos particulares**

- Identificar los tipos celulares donde se localiza el neuropéptido NPY y el VIP en el ovario izquierdo de pollo
- Identificar las poblaciones celulares catecolaminérgicas por medio de la enzima TH en el ovario izquierdo de pollo



## **MATERIAL Y MÉTODO**

Para la realización del estudio, se emplearon huevos fértiles de pollo de la raza White Leghorn (*Gallus gallus*) provenientes de “Aves Libres de Patógenos Específicos, S. A. de C. V. (ALPES), ubicada en Tehuacán-Puebla, México.

El huevo se mantuvo en una incubadora con aire forzado con rotación (Jamesway, Cánada), a una temperatura de 37.8°C y al 80% de humedad. Una vez que transcurrieron los 21 días de incubación, los huevos fueron transferidos a una zona dentro de la misma incubadora, denominada área de nacimiento, hasta que ocurrió la eclosión. Posteriormente los animales se trasladaron a cajas especiales en el laboratorio, en buenas condiciones de limpieza. Se les proporcionó agua y comida *ad libitum* en un espacio con adecuada ventilación, exponiendo a los pollos a un ciclo de luz/oscuridad de 14/10 horas, los días que indica el protocolo. El manejo y sacrificio de los animales se realizó tomando en cuenta las normas establecidas por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina, la UASLP (BGFMUASLP) y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Los animales se sacrificaron por decapitación, se obtuvieron los ovarios izquierdos de embriones de 11, 13 y 18 días de incubación, recién eclosionados y de animales de 2, 4, 7 y 15 días posteclosión. Se utilizaron en promedio 10 gónadas por edad, así como para cada uno de los experimentos realizados. Se utilizaron técnicas de inmunomarcaje para detectar la distribución de los neuropéptidos y de las enzimas TH y NSE-gama para comparar la distribución entre estas moléculas.

### **Técnica histológica de rutina para cortes de parafina**

Los ovarios embrionarios y posteclosión se disecaron y fijaron en formol amortiguado al 10% con buffer de fosfatos 0.15 M, pH 7.4, durante 12 hrs. a 4°C y se lavaron con el mismo amortiguador 3 veces. Se llevó a cabo la deshidratación progresiva en inmersión



en etanol al 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100% 10 min. cada cambio y se aclararon con Xilol. Se infiltraron e incluyeron en parafina a 56°C. Con un micrótopo (American Optical Mod. 820), se realizaron cortes de 4µm y se recogieron en portaobjetos cargados (Starfrost) para posteriormente realizar la técnica de inmunohistoquímica (Mayer y Walker, 1990).

### **Inmunohistoquímica**

Los cortes se colocaron en la estufa a 56°C por 30 min y se desparafinaron con 2 cambios de xilol por 15 min. Se rehidrataron en inmersión de alcoholes graduales, etanol al 100%, 90%, 80%, 70%, 60% y 50% cada cambio de 10 min., se lavaron con agua bidestilada y se pasaron a buffer Tris salino (TBS) 0.1M pH 7.8 con tritón al 0.1%. Se realizó la recuperación de antígenos con microondas en buffer de citratos pH 6, 0.1M, en baño maría con agua destilada por 5 min. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente (TA). Los cortes se permeabilizaron en TBS 0.1M pH 7.8 con tritón al 0.1% por 10 min., se incubaron con peróxido de hidrógeno al 0.3% en TBS por 10 min. y se lavaron con el mismo amortiguador. Los antígenos no específicos se bloquearon con Power Block del Kit Super Sensitive™ Polymer-HRP IHC Detection System (BioGenex) durante 10 min, se incubaron con el anticuerpo primario una noche en cámara húmeda a 4°C. Los anticuerpos primarios que se utilizaron para este trabajo son: el anticuerpo policlonal de conejo Anti-Péptido Intestinal Vasoactivo (SIGMA) 1:250; el anticuerpo policlonal de conejo Anti-Neuropéptido Y (SIGMA) 1:300; el anticuerpo monoclonal de ratón Anti-Tirosina Hidroxilasa (20/40/15) (CHEMICON INTERNATIONAL) 1:150; y el anticuerpo monoclonal de ratón Anti-NSE-P1 (Abcam) 1:150. Como control de la técnica, algunas laminillas fueron tratadas sin el anticuerpo primario. Se lavaron, se incubaron con el Súper Enhancer Reagent del kit Super Sensitive™ Polymer-HRP IHC Detection System (BioGenex) por 20 min a TA, se lavaron y se incubaron con el polímero-HRP/DAB del mismo Kit por 30 min y se lavaron de nuevo. Se revelaron con diaminobencidina (DAB) del KIT DAB chromogen (BIOCARE MEDICAL). Se lavaron con agua bidestilada, se montaron con glicerol al 90% en PBS, se observaron y fotografiaron con un microscopio



(Olimpus CX31). Algunas laminillas se contratiñeron con hematoxilina eosina (H/E) (Aguirre-Benítez, 2009).

Para verificar la especificidad de la inmunoreactividad se realizaron controles de Preabsorción, donde se incubó durante 1 hora a 37°C el péptido de VIP (33µg/ml) con su anticuerpo primario a concentraciones de 1:250, 1:500 y 1:1000 y posteriormente se incubó en cortes de tejidos de ovario izquierdo e intestino de pollo toda la noche a 4°C. Se trabajo con los kits ya mencionados.

Se realizaron controles positivos del experimento en cortes de intestino, donde la marca ya ha sido probada, para cada uno de los anticuerpos (Aisa y col., 1997; Suzuki y col., 1994).

#### **Técnica de microscopía electrónica para cortes semifinos.**

Los ovarios embrionarios y posteclosión se disecaron y fijaron en glutaraldehído 4% amortiguado con buffer de cacodilatos 0.15, pH 7.4, durante 4hrs. a 4°C. Los tejidos se lavaron con el mismo amortiguador y posteriormente se postfijaron con tetraóxido de osmio al 1% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M, durante 1 h a 4°C, se lavaron tres veces en el mismo amortiguador. Las muestras se deshidrataron en inmersión de alcoholes graduales del 30% al 100% de 10 min. cada cambio, se realizó una segunda deshidratación con oxido de propileno y se infiltraron en una mezcla de resina epóxica (EMbed 812) y oxido de propileno primero 1:1 y después 3:1, incrementando paulatinamente la resina en un tiempo de 12-24 hrs. a temperatura ambiente.

Las muestras se preincluyeron en resina epóxica nueva durante dos horas a TA, se incluyeron en un segundo cambio de resina y se polimerizó a 60°C durante 48hrs. Se realizaron cortes semifinos de 0.5µm con un ultramicrotomo Ultracut (Reichert), y fueron teñidos con azul de toluidina para su posterior observación en un microscopio de luz Polyvar (Reichert).



## **RESULTADOS**

La morfología del ovario izquierdo de pollo de edades embrionarias de 11, 13 y 18 días de incubación, recién eclosionados y de 2, 4, 7 y 15 días posteclosión, fue estudiada, por medio de cortes semifinos en resina, teñidos con azul de toluidina, para identificar las poblaciones celulares del ovario izquierdo de pollo. Con técnicas de inmunomarcaje, se identificaron los neuropéptidos VIP y NPY y las enzimas TH y NSE.

### **ANÁLISIS MORFOLÓGICO DEL OVARIO DE POLLO**

El análisis morfológico mostró, en las diferentes edades embrionarias, una corteza rodeada por un epitelio superficial cilíndrico y se notó un aumento en su grosor conforme avanzó el desarrollo. En esta zona se localizaron cúmulos de ovocitos con citoplasma claro y un núcleo evidente, rodeados por células pregranulosas y divididos por tabiques de tejido conectivo. Por debajo de la corteza se observó la médula delimitada por la falsa albugínea. Entre el estroma ovárico de la médula se identificaron células esteroiogénicas, células poco diferenciadas, vasos sanguíneos, tejido conectivo, canales lacunares propios de aves y ganglios intraováricos que permanecieron conforme avanzó el desarrollo (Fig.12a, 12b y 12c).

En el ovario de pollos recién nacidos, el epitelio superficial y la corteza mostraron un aumento de grosor. Se observaron ovocitos más grandes y algunos en degeneración muy cerca de canales lacunares para su eliminación. Se notó un aumento en el tamaño de los cordones de células esteroiogénicas (Fig.12d). Para el 2° día posteclosión, se pudo apreciar un aumento en el grosor de la corteza y una reorganización en las células pregranulosas que empezaron a rodear a algunos ovocitos que posteriormente formarán la capa granulosa (Fig.13a).

Al 4to día posteclosión, la división entre corteza y médula comienza a ser difusa, aunque en algunas zonas aun se distinguen los nidos de ovocitos. Los folículos ya presentan la capa de la granulosa por lo que son llamados folículos primarios (Fig.13b).

Para el 7mo y 15vo día posteclosión, las poblaciones celulares de la corteza de la médula se han mezclado y en la región cortical se distinguen los folículos primarios de mayor



tamaño y en mayor cantidad. A esta edad los folículos en crecimiento comienzan a rodearse por las células del estroma ovárico que posteriormente serán las tecas interna y externa (Fig.13c y 13d).

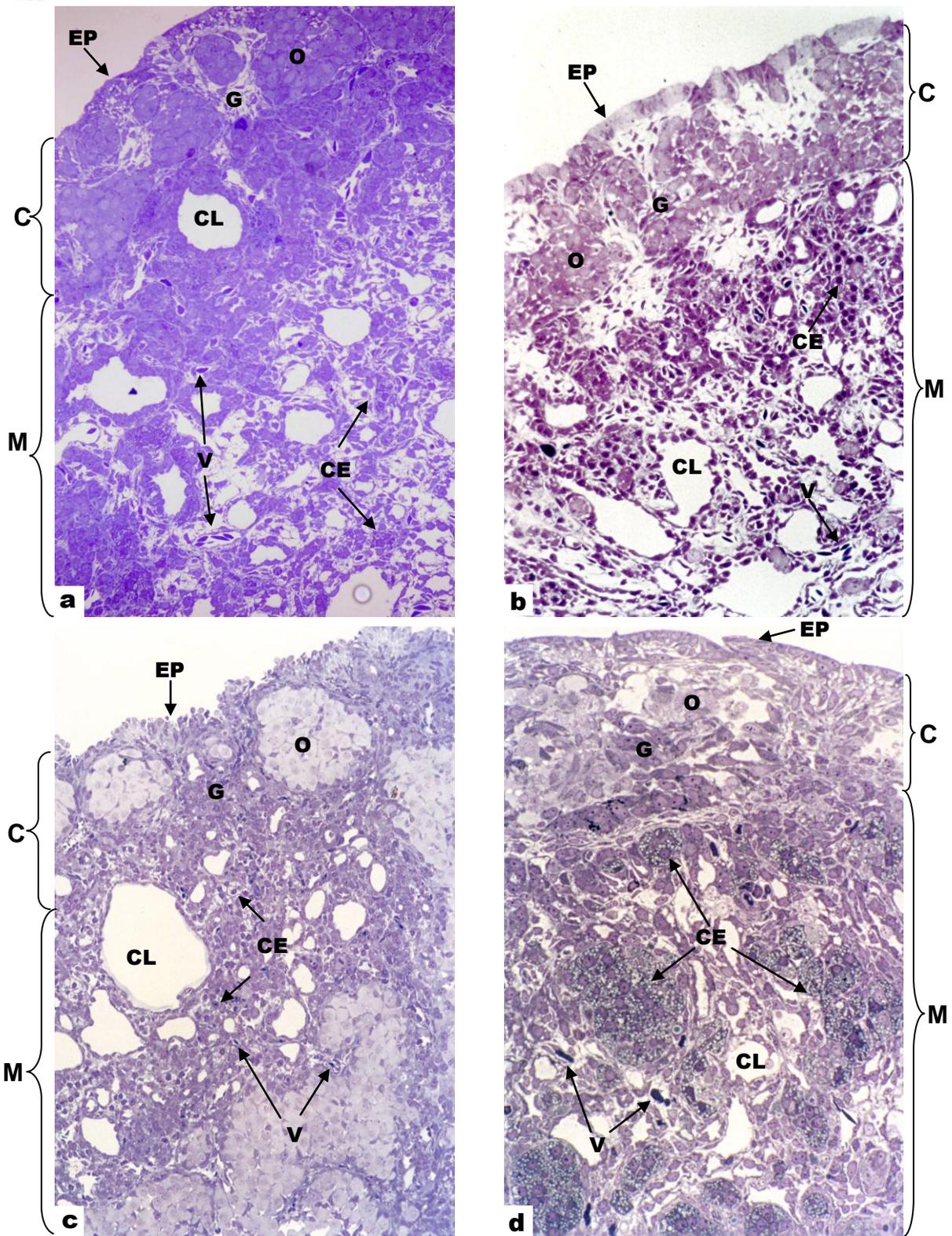


Fig. 12. Cortes de ovario izquierdo de pollo teñidos con azul de toluidina a) 11 días de incubación. 40X b) 13 días de incubación. 40X c) 18 días de incubación 40X d) recién eclosionados 40X. Corteza (C), epitelio superficial (EP), nidos de ovocitos (O), células pregranulosas (G), médula (M), células esteroidogénicas (CE), canales lacunares (CL), vasos sanguíneos (V).

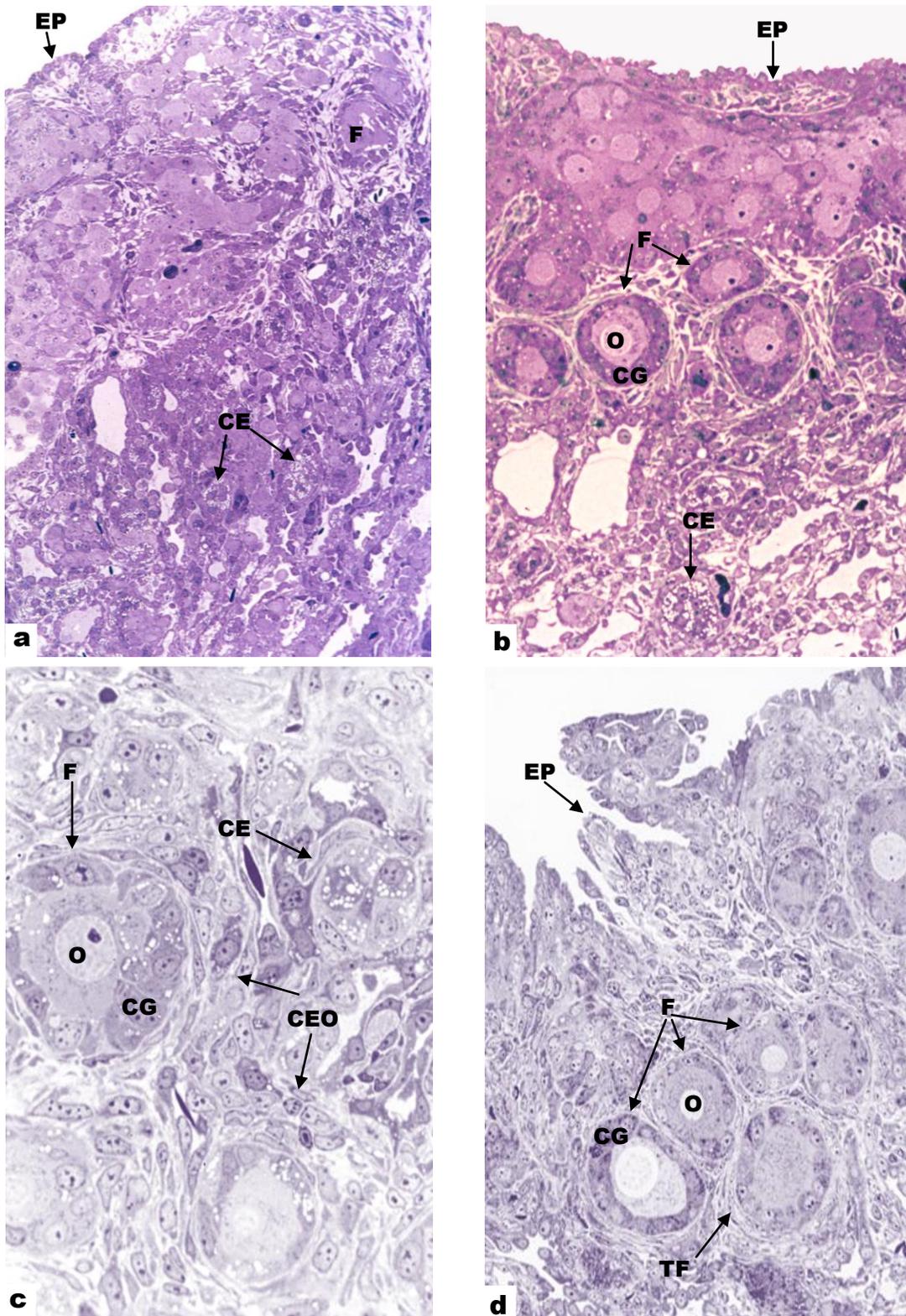
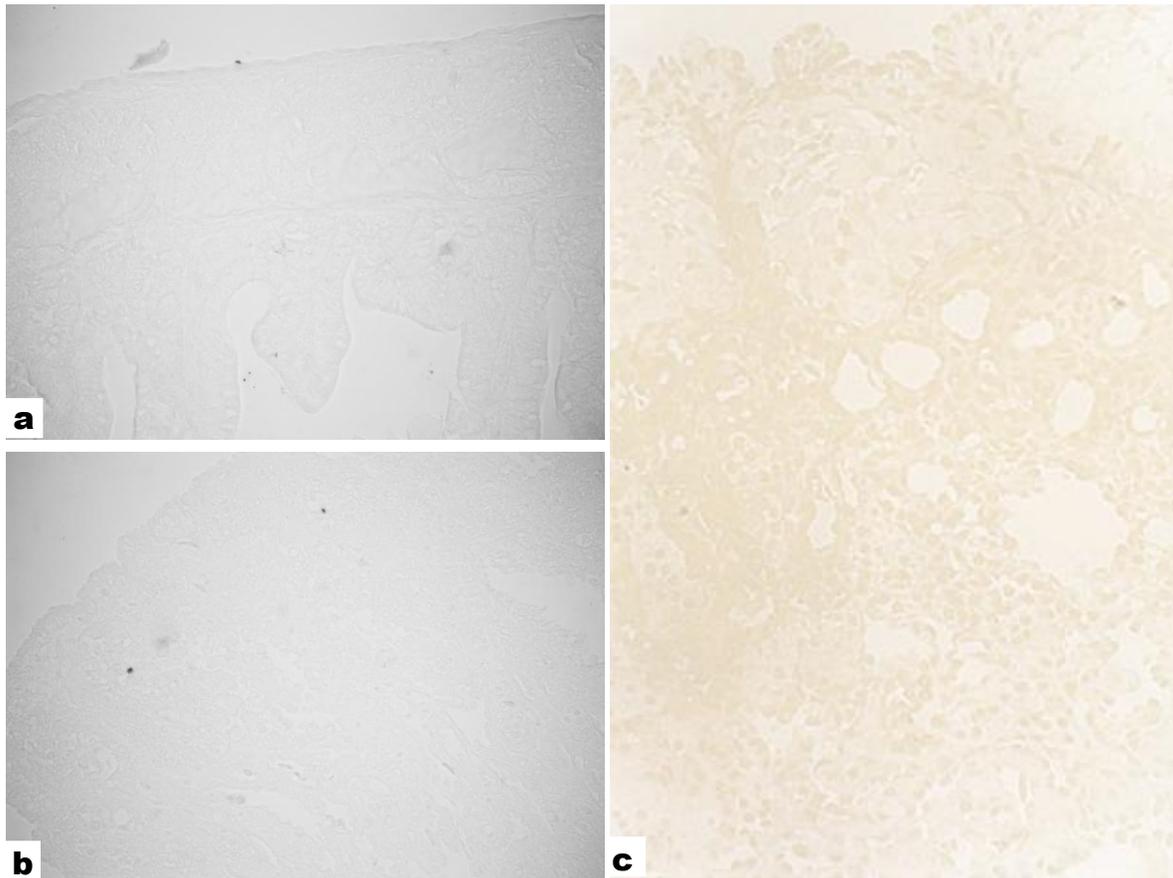


Fig. 13. Corte de ovario de pollo de a) 2 días posteclosión 40X b) 4 días posteclosión 40X c) 7 días posteclosión 100X d) 15 días posteclosión 40X. Se observan folículos en crecimiento (F). Epitelio superficial (EP), Células esteroidogénicas (CE), Células del estroma ovárico (CEO), Tecas foliculares (TF). Ovocito (O), Capa de la granulosa (CG).

### Controles de preabsorción

Cada uno de los experimentos de control realizados comprobaron la especificidad de los anticuerpos utilizados para este estudio:

- Los controles de preabsorción demostraron la especificidad del anticuerpo para VIP en el intestino y ovario izquierdo de pollo. (Fig. 14 a y b).
- Los controles donde se omitió el anticuerpo primario demostró la especificidad del anticuerpo secundario (Fig.14c).



**Fig. 14. Controles a) de Preabsorción con una concentración de 1:1000 en intestino de pollo de 7 días posteclosión. 40X b) de Preabsorción con una concentración de 1:1000 en ovario de pollo de 3 días posteclosión. 40X c) sin anticuerpo primario en ovario de pollo de 19 días de incubación. 40X**

Con los experimentos de control positivo se demostró la presencia de VIP, NPY, TH y NSE en el intestino de pollo (Fig. 15).

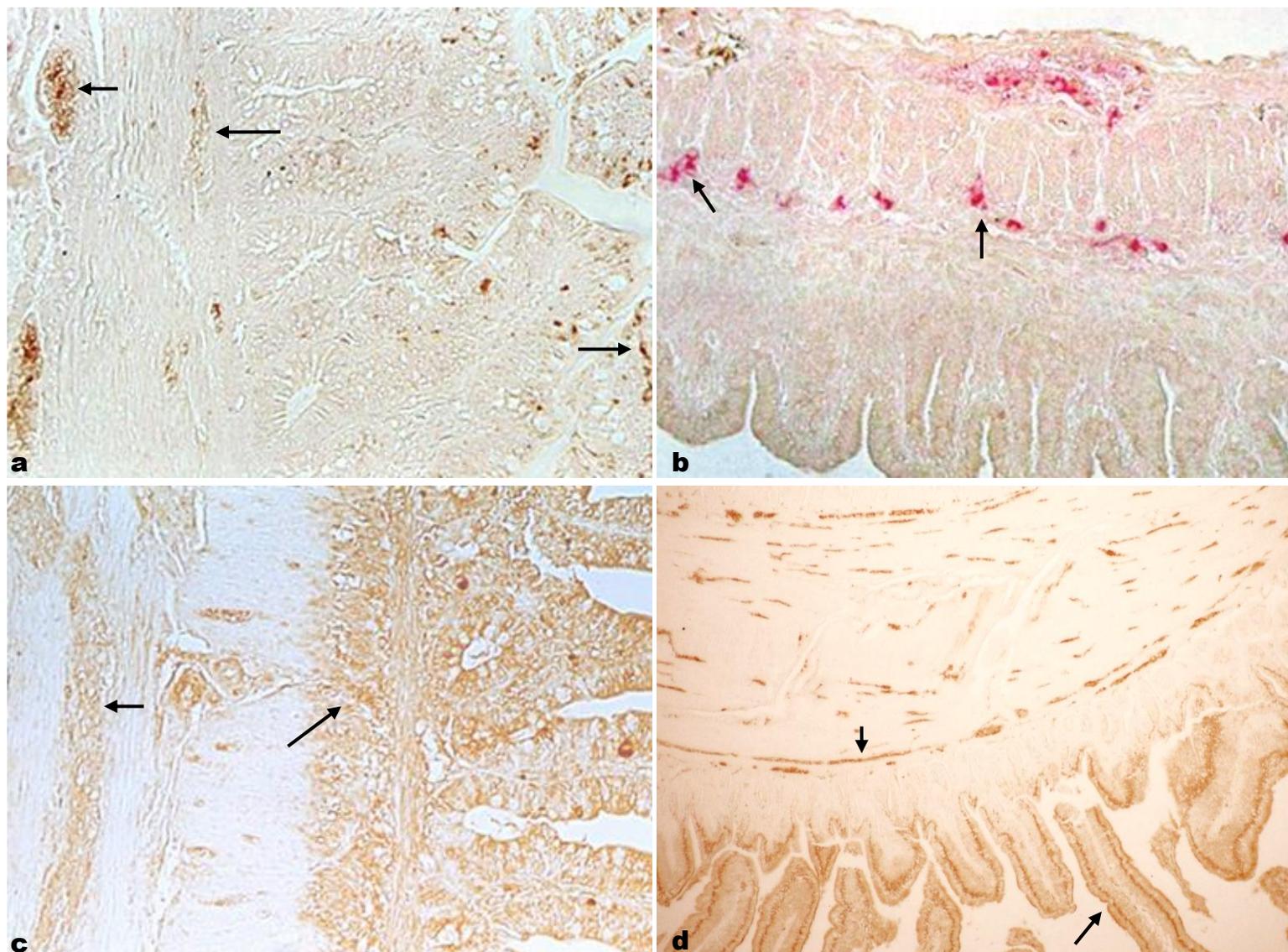


Fig. 15. Controles de inmunomarcaje positivo (↑) en intestino de pollo. a) NPY 40X b) VIP 10X c) TH 40X d) NSE 10X



## **INMUNOMARCAJE PARA VIP**

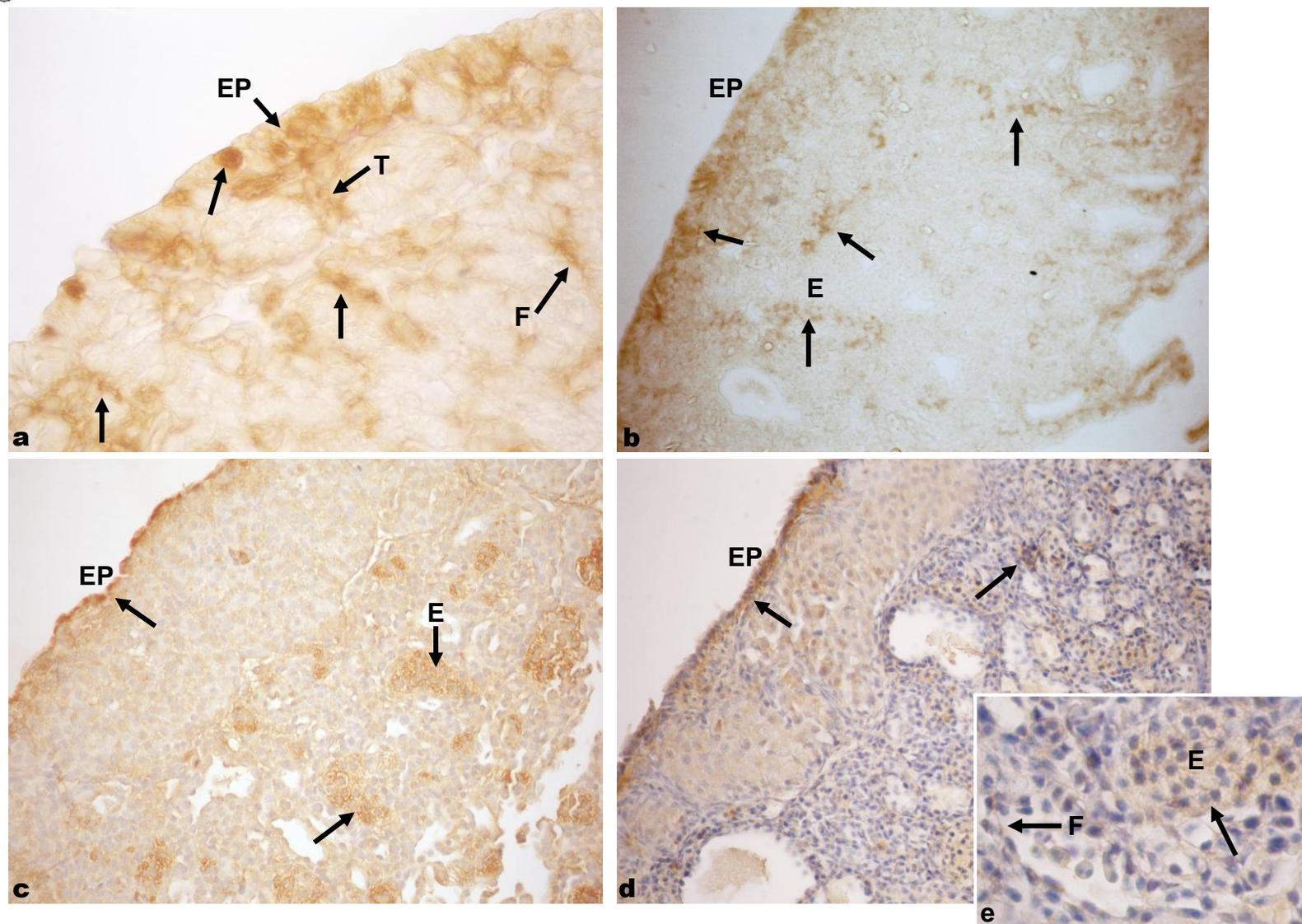
El inmunomarcaje positivo para VIP se identificó en el ovario izquierdo de pollo en todas las edades estudiadas.

A los 11 días de incubación, se detectó la inmunotinción para VIP en las células del epitelio superficial, aunque el marcaje no se observó de manera uniforme y también se encontró marca positiva para VIP en los tabiques que delimitan los nidos de ovocitos. En la médula, el VIP se observó en fibras nerviosas asociadas a los cordones de células esteroideogénicas, en el endotelio de los vasos sanguíneos y en los ganglios intraováricos (Fig.16a). En el 13vo días de incubación, la marca de VIP se encontró de manera similar que a los 11 días de incubación y a los 18 días de incubación se notó el marcaje en la mayoría de las células del epitelio superficial y en el citoplasma de las células esteroideogénicas (Fig.16 b y c).

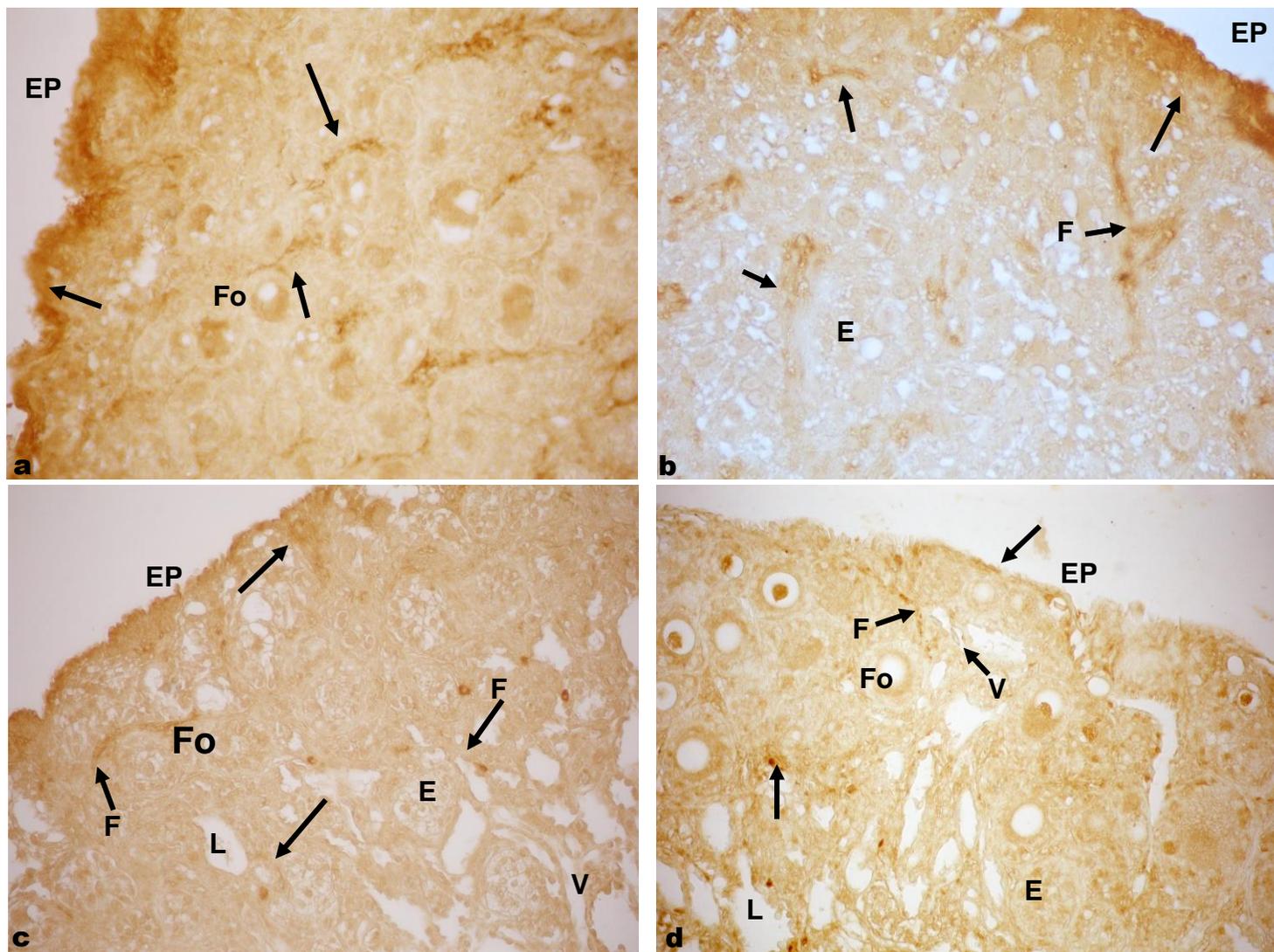
En el día de la eclosión, el inmunomarcaje para VIP se observó en el epitelio superficial y se mantuvo en los cordones de células esteroideogénicas y en fibras nerviosas hacia vasos sanguíneos (Fig. 16d).

A los 2 y 4 días posteclosión, VIP se mantuvo en el epitelio superficial y se observaron fibras nerviosas positivas a VIP que se proyectaron hacia los folículos en formación. En la médula se encontró inmunomarcaje para VIP en las fibras que inervan a los canales lacunares y células esteroideogénicas (Fig. 17 a y b).

A los 7 y 15 días posteclosión el marcaje se mantuvo en el epitelio superficial y se observaron fibras positivas para VIP en contacto con folículos en crecimiento. En el estroma ovárico, las fibras inmunomarcadas para VIP se observaron inervando células esteroideogénicas y vasos sanguíneos (Fig. 17 c y d).



**Fig. 16.** Inmunomarcaje para VIP (↑) en corte de ovario de pollo. a) 11 días de incubación 100X b) 13 días de incubación 40X c) 18 días de incubación 40X H/E d) recién eclosionado H/E 40X. La marca se observa en el epitelio superficial (EP), en los tabiques de tejido conectivo (T) que rodea a los ovocitos y hacia cordones de células esteroidogénicas (E). e) detalle del marcaje en células esteroidogénicas y de fibras nerviosas (F) en los vasos sanguíneos.



**Fig. 17.** Inmunomarcaje para VIP (↑) en ovario de pollo. a) 2 días posteclosión 40X b) 4 días posteclosión 40X c) 7 días posteclosión 40X d) 15 días posteclosión 40X. La marca se observa en el epitelio superficial (EP), en fibras nerviosas (F) que llegan a los cordones de células esteroidogénicas, folículos en crecimiento (Fo) canales lacunares (L) y vasos sanguíneos (V).



## **INMUNOMARCAJE PARA NPY**

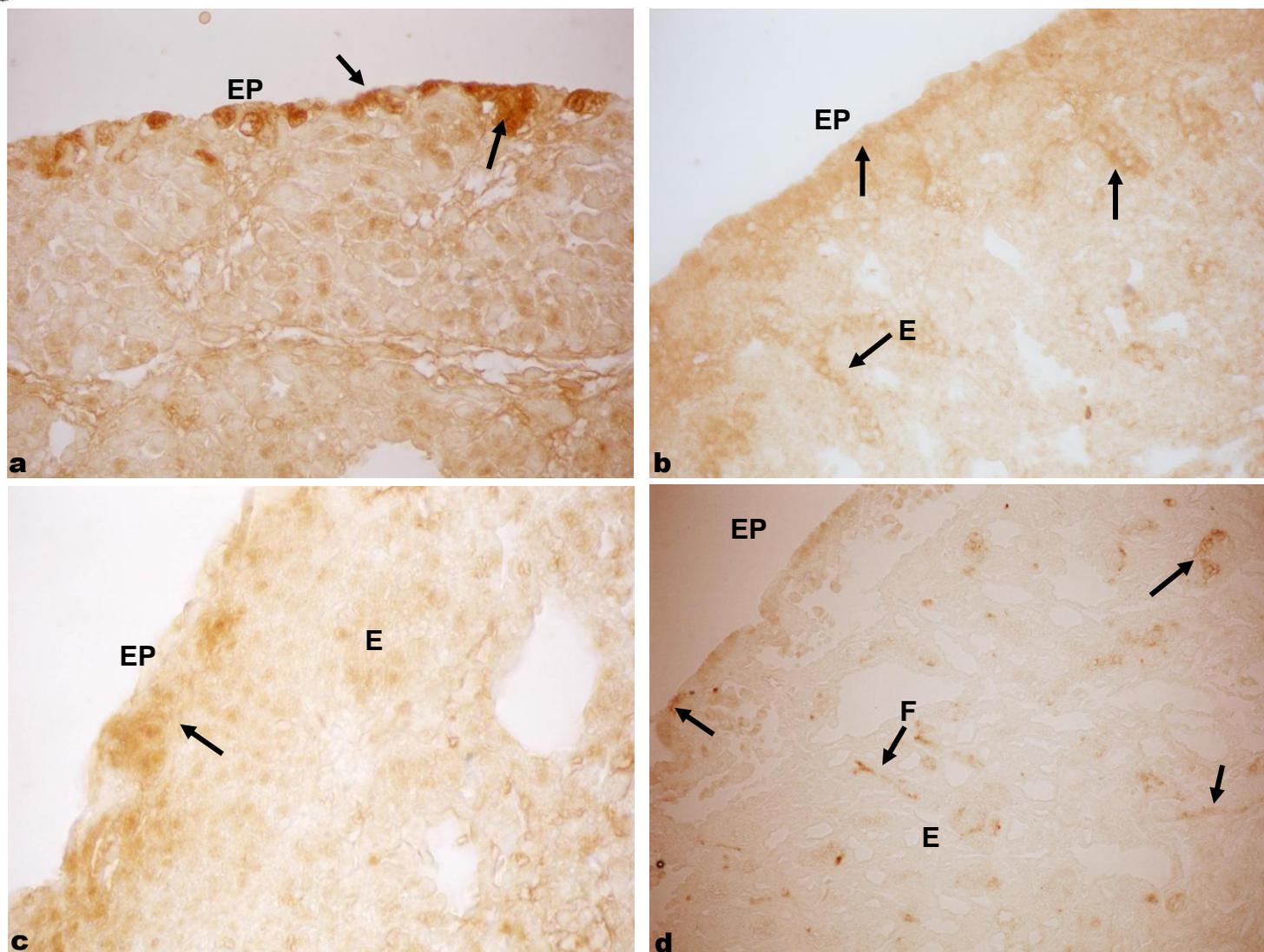
El inmunomarcaje para NPY se observó en el ovario de pollo desde los 11 días de incubación hasta los 15 días posteclosión.

A los 11 días de incubación el marcaje se encontró en las células del epitelio superficial de la corteza ovárica. En la médula se observó en cordones esteroidogénicos. También se encontró marca en los ganglios intraováricos (Fig. 18a). A los 13 y 18 días de incubación el marcaje se mantuvo en el epitelio superficial y en cordones esteroidogénicos (Fig. 18b y c).

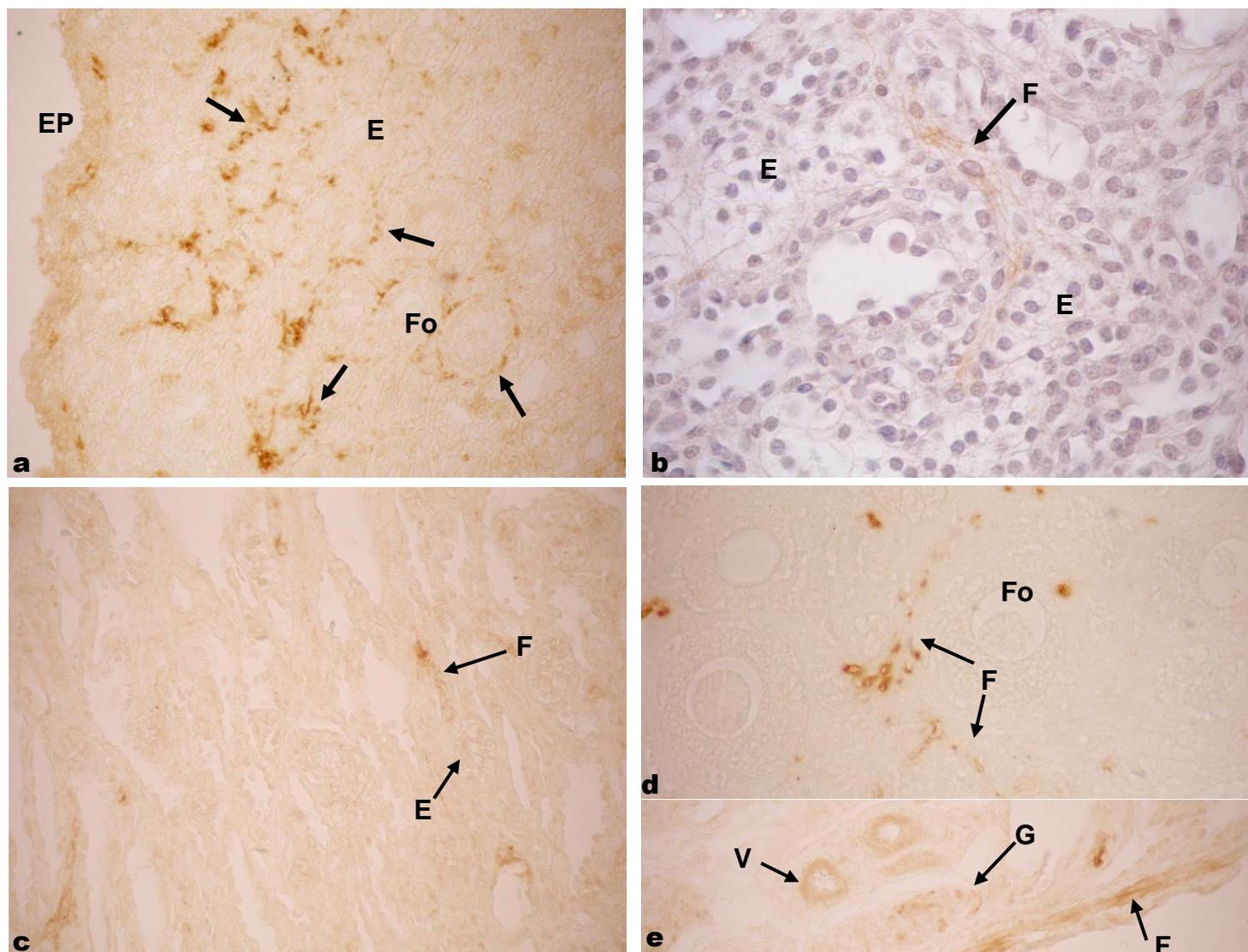
En los pollitos recién nacidos y de 2 día posteclosión, NPY se observó más en fibras nerviosas hacia cordones de células esteroidogénicas y vasos sanguíneos. A los 2 día posteclosión se observan fibras nerviosas adyacentes a los folículos en formación (Fig. 18d y 19a).

A los 4 día posteclosión, la marca se encontró en fibras nerviosas hacia los folículos en formación. En la zona medular, el marcaje se identificó en las fibras que inervan células esteroidogénicas (Fig. 19b).

A los 7 y 15 día posteclosión, la marca para NPY fue muy similar a las edades anteriores. El inmunomarcaje para NPY estuvo presente en fibras nerviosas hacia los folículos en crecimiento, células esteroidogénicas, vasos sanguíneos y ganglios adyacentes (Fig. 19 c y d).



**Fig. 18.** Inmunomarcaje para NPY (↑) en corte de ovario de pollo. a) 11 días de incubación. 100X b) 13 días de incubación 40X c) 18 días de incubación 100X d) recién eclosionados 40X. La marca se observa en células del epitelio superficial (EP), en fibras nerviosas (F) que rodean a los ovocitos y hacia cordones de células esteroidogénicas (E).



**Fig. 19.** Inmunomarcaje para NPY (↑) en ovario de pollo. a) 2 días posteclosión 40X b) 4 días posteclosión 100X c) 7 días posteclosión 100X d) 15 días posteclosión 100X. La marca se observa en fibras nerviosas (F) que llegan a los cordones de células esteroidogénicas (E) y hacia los folículos en crecimiento (Fo). e) Detalle de fibras nerviosas en vasos sanguíneos (V) y ganglios intraováricos (G).



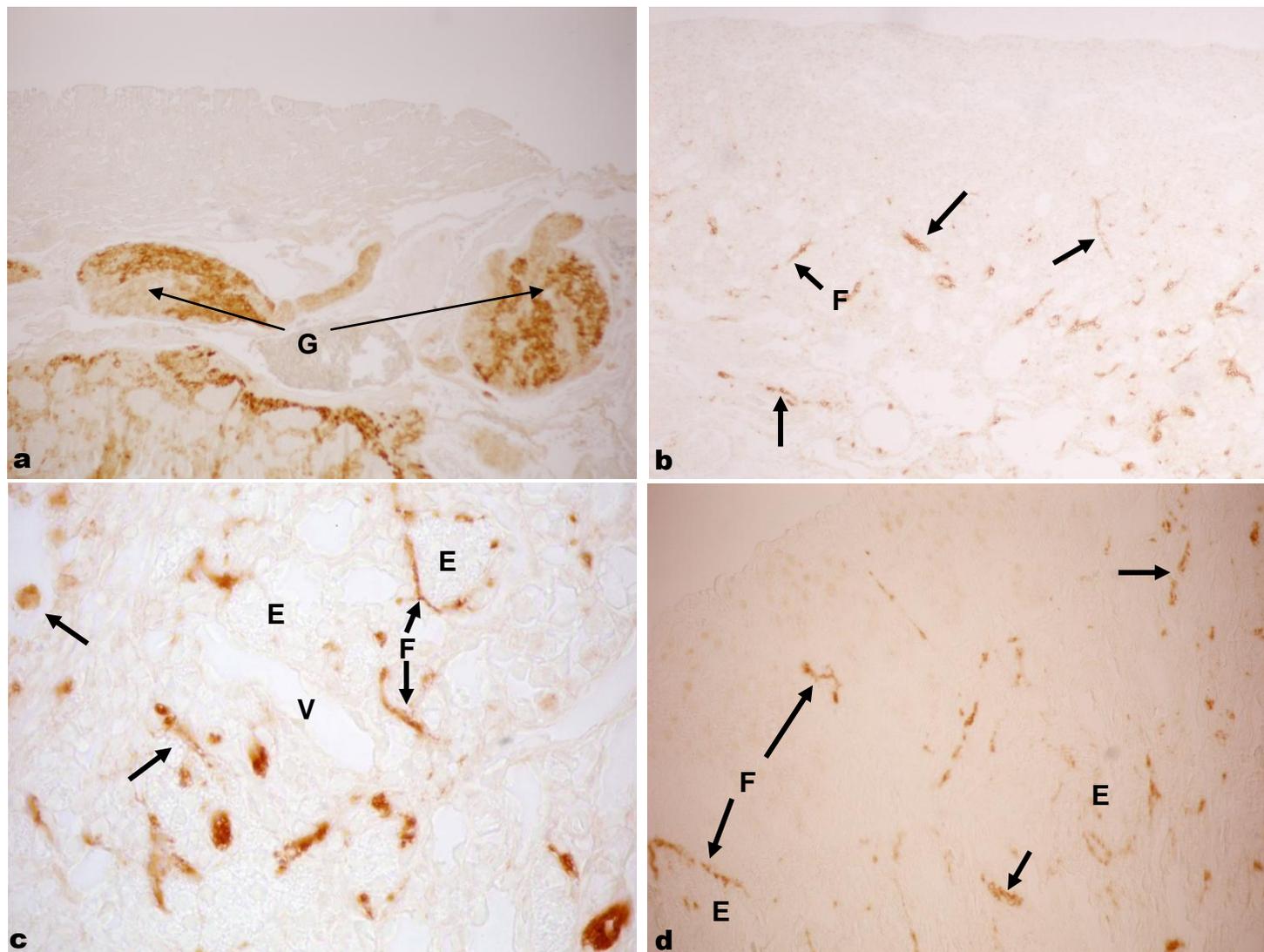
## **INMUNOMARCAJE PARA TH**

En el ovario de pollo en edades embrionarias de 11 y 13 días de incubación se localizaron fibras nerviosas positivas para TH, principalmente en la médula profunda y en los ganglios intraováricos (Fig. 20a). Este marcaje también se puede observar a los 18 días de incubación, donde las fibras nerviosas son más evidentes (Fig. 20b).

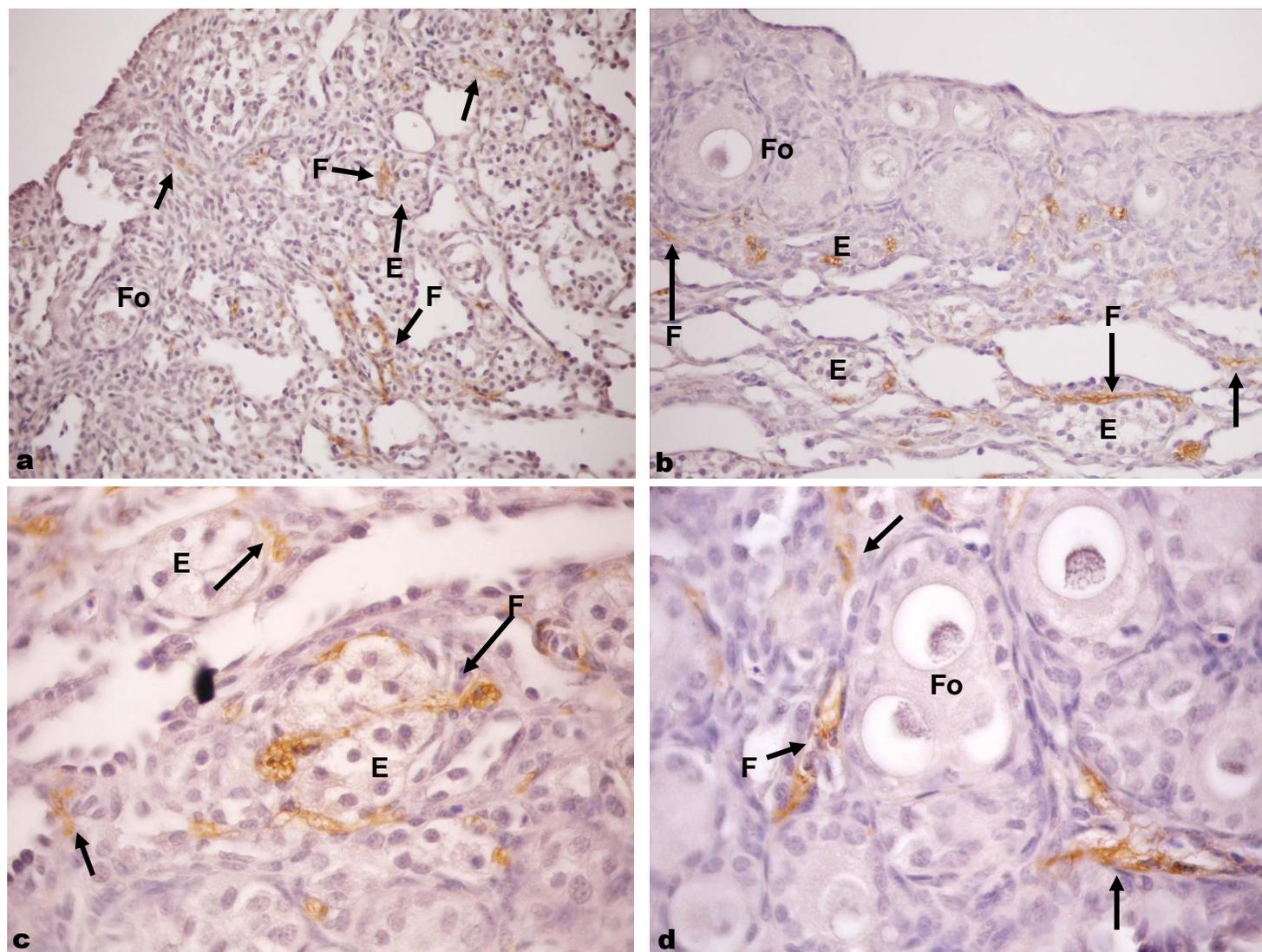
En los ovarios de pollos recién eclosionados, se localizaron fibras nerviosas positivas a TH inervando cordones esteroidogénicos y vasos sanguíneos (Fig. 20c).

A los 2 y 4 días posteclosión, las fibras nerviosas positivas para TH se observan en la médula profunda y en la médula subcortical hacia cordones de células esteroidogénicas (Fig. 20d).

A los 7 días posteclosión, se observan más fibras nerviosas THérgicas hacia cordones de células esteroidogénicas y algunas fibras nerviosas hacia folículos en formación (Fig. 21a). Este marcaje se mantiene hasta los 15 días posteclosión, donde las fibras nerviosas positivas a TH se hacen más evidentes en los cordones de células esteroidogénicas y hacia los folículos en crecimiento (Fig. 21b, c y d).



**Fig. 20.** Inmunomarcaje para TH (↑) en corte de ovario de pollo. a) 13 días de incubación. 10X b) 18 días de incubación 40X c) recién eclosionados 100X d) 4 días posteclosión 40X. La marca se observa en fibras nerviosas (F) dentro de la médula profunda, hacia vasos sanguíneos (V), cordones de células esteroideogénicas (E) y en ganglios intraováricos (G).



**Fig. 21. Inmunomarcaje para TH (↑) en ovario de pollo. a) 7 días posteclosión 40X b) 15 días posteclosión 40X c) 15 días posteclosión 100X d) 15 días posteclosión 100X. La marca se observa en fibras nerviosas (F) que llegan a células esteroidogénicas (E), a folículos en crecimiento (Fo).**



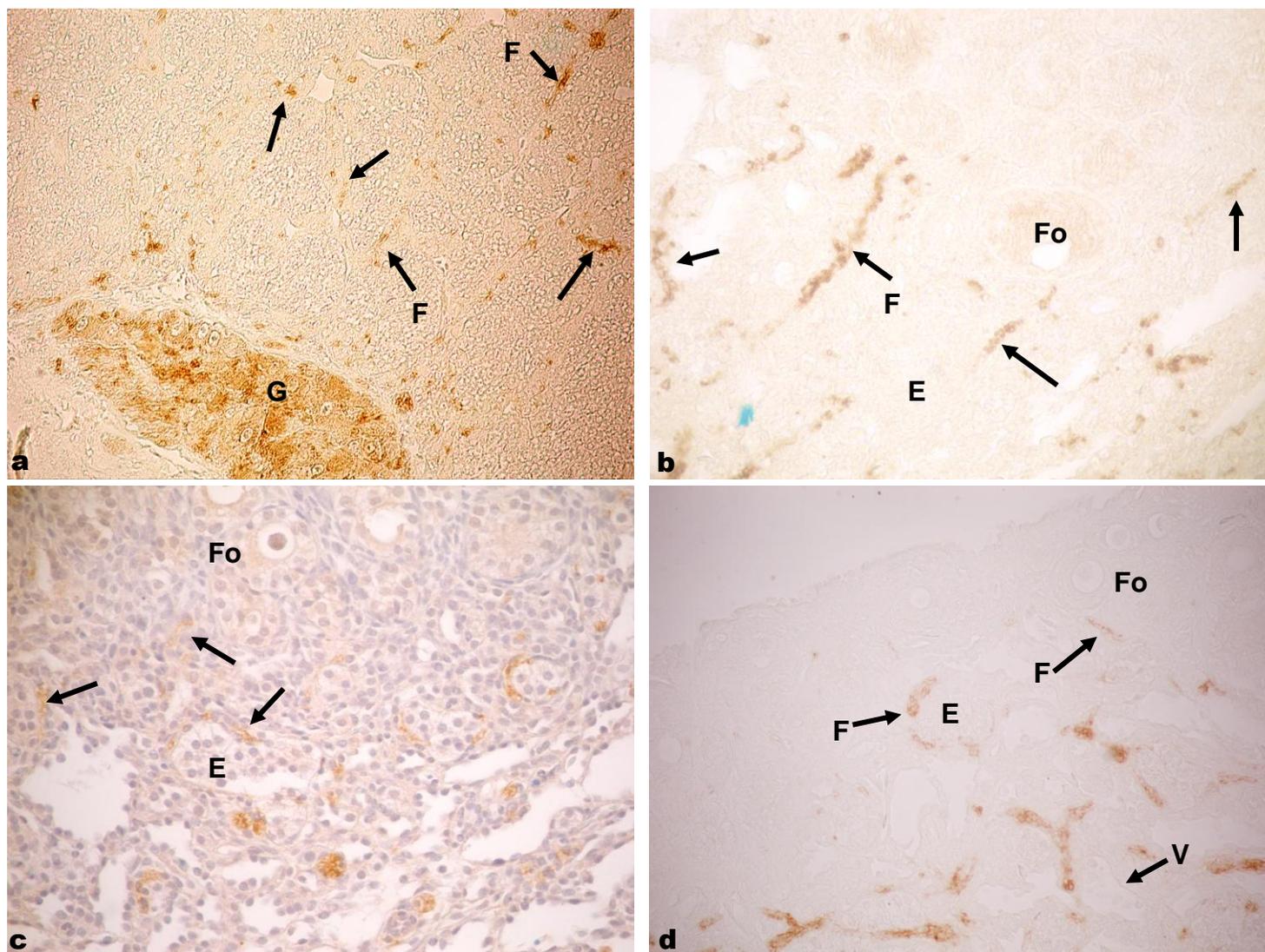
## **INMUNOMARCAJE PARA ENOLASA**

La enolasa reveló la presencia de fibras nerviosas y ganglios inmunomarcados desde los 11 días de incubación hasta los 15 días posteclosión.

A los 11 días de incubación, la enolasa mostró fibras nerviosas en la zona medular profunda y en los ganglios intraováricos, marcaje que se mantuvo hasta el día del nacimiento (Fig. 22a).

A partir de los 2 días posteclosión, se aprecian fibras nerviosas entre los folículos en formación y se mantiene el marcaje en la médula hacia las células esteroideogénicas (Fig. 22b).

Desde los 4 días posteclosión, se observa una mayor cantidad de fibras nerviosas desde la médula profunda hasta las células esteroideogénicas y los folículos en crecimiento. Este marcaje se mantiene constante hasta los 15 días posteclosión (Fig. 22 c y d).



**Fig. 22.** Inmunomarcaje para NSE (↑) en corte de ovario de pollo. a) Recién eclosionado 40X b) 2 días posteclosión 100X c) 7 días posteclosión 40X d) 15 días posteclosión 40X. La marca se observa en fibras nerviosas (F) distribuidas en la médula profunda, en ganglios intraováricos (G) y hacia folículos en crecimiento (Fo) y células esteroidogénicas (E).



## DISCUSIÓN

En este trabajo se evidenció por primera vez la presencia de NPY en el ovario de pollo embrionario y posteclosión. Asimismo, se detectó el VIP y la enzima TH en el mismo tejido. Los resultados revelaron que en la etapa embrionaria, ambos neuropéptidos se encuentran en el epitelio superficial de la corteza y en fibras nerviosas de la médula asociadas a canales lacunares, vasos sanguíneos, células esteroideogénicas y ganglios adyacentes. La TH fue identificada en fibras nerviosas de la médula profunda y subcortical, asociadas de la misma manera que los neuropéptidos a las células esteroideogénicas, vasos sanguíneos y ganglios. En la etapa postnatal, tanto los neuropéptidos como la TH se encontraron distribuidos de manera similar; además de encontrarse en fibras nerviosas que inervan folículos en crecimiento. Esta inmunodetección concuerda con la reportada en las fibras nerviosas medulares del ovario de rata (Ahmed y col., 1986; Allen y col, 1989; McDonald, 1990) y bovino (Hulshof y col, 1994).

El ovario izquierdo de pollo a los 11 días de incubación presentó una corteza delgada; la cual, en etapas posteriores presentó un engrosamiento por el crecimiento de los ovocitos, la proliferación de las células prefoliculares y del estroma, células que después de la eclosión formarán los folículos. A partir de esta etapa, los neuropéptidos VIP y NPY se encontraron distribuidos en células del epitelio superficial, el VIP mantuvo esta distribución en la etapa posteclosión. El marcaje de NPY disminuyó, de modo que a los 15 días posteclosión ya no fue detectado en estas células. En la médula, ambos neuropéptidos fueron observados en fibras nerviosas asociadas a vasos sanguíneos, células esteroideogénicas y canales lacunares. El inmunomarcaje para VIP observado en este estudio concuerda con lo reportado en la literatura para los mamíferos: en fibras nerviosas en la corteza ovárica, alrededor de los folículos en diferentes estados de desarrollo, dentro del tejido intersticial y en estrecha asociación con la vasculatura ovárica de rata, vaca, cerdo, humano (Kannisto y col., 1986) y bovino (Hulshof y col., 1994); sin embargo, en este estudio se observó en el citoplasma de los grupos de células esteroideogénicas. El NPY ha sido localizado en fibras nerviosas del tejido intersticial, alrededor de los vasos



sanguíneos y entre los folículos primordiales del ovario prepúber de rata (McDonald, 1990) y ovario prenatal de humano (Jorgensen y col., 1996).

La detección de los neuropéptidos en las células epiteliales de la corteza en etapa embrionaria, podría asociarse con la proliferación de las células pre-foliculares lo cual aumenta el grosor de la corteza; ya que una de las funciones del VIP es estimular la mitosis de las células granulosas a través del incremento intracelular de AMPc (Cecconi y col., 2004). Su localización en la corteza sugiere que forman parte del conjunto de moléculas que podrían favorecer el desarrollo de la corteza. Aunque los neuropéptidos llegan al ovario por medio de la inervación extrínseca, algunos son producidos por neuronas intrínsecas y células no neuronales del ovario; esto de acuerdo a Mayerhofer y colaboradores (1998) quienes evidenciaron neuronas en el ovario de mono y de humano que contienen NPY y catecolaminas. Esto fue determinado mediante la detección de la expresión de los genes que codifican para las enzimas que sintetizan las catecolaminas TH y dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (Mayerhofer y col., 1998). Por otro lado, Gozes y Tsafiriri (1986) mostraron la expresión de ARNm del VIP en el ovario de la rata. Estos experimentos demuestran una síntesis local de neuropéptidos y neurotransmisores; la cual podría relacionarse con el marcaje observado en células no neuronales en este estudio.

Los folículos primordiales y primarios fueron observados a partir de los 2 días posteclosión; fue desde el día 4 y hasta los 15 días posteclosión que se observó la organización de las tecas. Durante este periodo, el marcaje para NPY y VIP se observó en las fibras nerviosas adyacentes a los folículos. Se ha propuesto que la función de las fibras nerviosas en los folículos de mamíferos es la regulación del flujo vascular y con la función sensorial, así como a la liberación de neurotransmisores como las catecolaminas y los neuropéptidos (Burden col., 1983; Ahmed y col., 1986; Bahr y col., 1994; Markiewicz y col., 2003a y b). Estudios en un modelo de cultivo de ovario de rata neonatal demostraron que el VIP podía regular la maduración de los folículos primordiales a folículos primarios (Chen y col., 2013), mientras que NPY estimularía el flujo sanguíneo del sistema vascular del cuerpo lúteo y la secreción de oxitocina (Keator y col., 2010).



Desde los 11 días de incubación hasta los 15 días posteclosión se observaron fibras nerviosas inmunoreactivas para NPY y VIP en contacto con canales lacunares y con vasos sanguíneos. La función de estos neuropéptidos en la regulación del flujo sanguíneo ya ha sido demostrada. En el ovario de conejo se observó un marcaje positivo para VIP y NPY en fibras nerviosas asociadas a vasos sanguíneos y se demostró que el NPY ejerce un efecto vasoconstrictor (Tenmoku y col., 1988; Jorgensen y Sejrsen, 1990), mientras que VIP tiene un efecto vasodilatador (Tenmoku y col., 1988), lo cual regula la tasa de flujo sanguíneo. Keator y sus colaboradores (2010) propusieron que NPY es liberado de las fibras nerviosas que están localizadas alrededor de los vasos sanguíneos o entre de las células lúteas para actuar sobre los receptores NPY Y1, Y2 Y Y5 que se encuentran en las células endoteliales, lo que estimula la remodelación vascular y facilita la migración de células endoteliales.

Los canales lacunares son propios de aves y algunos reptiles y su función es de carácter linfático. Esto fue reportado por Nili y Kelly (1996), quienes mostraron en gallina ponedora que la función principal del sistema lacunar es ayudar en la eliminación del vitelo de grandes folículos atrésicos. En las edades estudiadas, la participación de los neuropéptidos en los canales lacunares podría ser la de ayudar a la eliminación de algunos ovocitos en proceso de degeneración.

Por otra parte, también se observó la asociación de fibras nerviosas positivas para VIP y NPY con grupos de células esteroideogénicas en todas las edades estudiadas. El estímulo de los neuropéptidos y los neurotransmisores liberados por las fibras nerviosas ha sido tema de estudio de diferentes grupos de trabajo y se ha reportado que el NPY y VIP modulan la secreción de algunos esteroides inducida por las gonadotropinas. Ambos péptidos regulan la producción de progesterona, andrógenos y estrógenos a nivel de las células de la granulosa en porcino (Pitzel y col., 1991), en las células luteinizantes de rata (Oliveros y col., 2001) y en humano (Barreca y col., 1998). Además se demostró que los estrógenos y la progesterona a su vez, incrementan la expresión y secreción del NPY en el hipotálamo. El hallazgo de los receptores de esteroides en las neuronas hipotalámicas que contienen NPY en la rata sugiere que este neuropéptido puede mediar las acciones de retroalimentación positiva de los esteroides (Barreca y col., 1998).



El VIP aumenta la actividad de la enzima aromatasa P450scc (George y Ojeda, 1987). El VIP es producido en los nervios ováricos y se ha visto que en cultivos de células de la granulosa de rata, induce la síntesis de las enzimas P-450scc y reductasa (Trzeciak y col., 1986). Ambas enzimas son componentes del complejo SSC, cuya actividad es la regulación de la síntesis de esteroides en el ovario. Trzeciak y colaboradores (1986) sugirieron que la estimulación de la síntesis de P-450scc puede ser un mecanismo fisiológico por el cual los nervios VIPérgicos y la producción local de VIP regulan la esteroidogénesis durante el desarrollo del ovario. En las aves la producción de hormonas esteroides es distinta que en mamíferos, inicia desde la etapa embrionaria independientemente de las gonadotropinas. Durante el desarrollo del ovario de pollo, los receptores a estos esteroides se encuentran antes de que el eje endocrino comience a funcionar (Bruggeman y col., 2002), el cual, en el ovario de pollo inicia su función desde el día 13.5 (Woods y Thommes, 1984).

Los estrógenos durante la diferenciación del ovario izquierdo de pollo (7.5 días de incubación) estimulan el desarrollo de la corteza de manera tal que si se bloquea a los receptores de estrógenos provoca la regresión de la gónada, lo cual ocurre en la gónada derecha (Andrews y col., 1997; Nakabayashi y col., 1998; Brunström y col., 2009). Los neuropéptidos, al ser moduladores de la esteroidogénesis podrían participar como uno de los factores que intervienen en el desarrollo del ovario; por lo que su presencia en las fibras nerviosas asociadas a las células productoras de esteroides en el ovario de embrión de pollo y posteclosión podría favorecer la organización estructural del ovario (Amanuma y Yamada, 1979).

Además del NPY y el VIP, las catecolaminas también intervienen en el control de las funciones del ovario de mamíferos (Greiner y col., 2008). La Tiroxina Hidroxilasa (TH), la enzima limitante en la síntesis de catecolaminas (López y col, 2010), fue utilizada en este trabajo para identificar la inervación catecolaminérgica en el ovario de pollo y compararla con la distribución de la inervación neuropeptidérgica. Al momento de la eclosión, las fibras nerviosas positivas a TH se localizaron inervando a los canales lacunares, cordones esteroidogénicos, vasos sanguíneos y en la musculatura lisa del estroma ovárico. En las



edades posteclosión este marcaje se mantuvo en fibras nerviosas de los cordones de células esteroideogénicas y se identificaron fibras nerviosas en los folículos en formación.

La norepinefrina (NE) ha sido identificada como la principal catecolamina implicada en el desarrollo del ovario, la esteroideogénesis, la foliculogénesis, la ovulación y el funcionamiento del cuerpo lúteo (Singh y col., 2010). La existencia de fibras catecolaminérgicas principalmente noradrenérgicas, ha sido determinada mediante la técnica del ácido glioxílico. Estas fibras se encontraron asociadas con células esteroideogénicas en la médula del ovario de pollo desde los 13 días embrionarios hasta el día 21 de incubación (Müller-Marschhausen y col., 1988). Aguirre-Benítez (2009), reportó la distribución de TH en numerosos tractos nerviosos localizados en la región medular e hilar del ovario de pollo a partir de los 13 días de incubación. Así mismo, se han descrito fibras nerviosas catecolaminérgicas en la médula del ovario de pollo posnatal asociadas a las células intersticiales y en el ovario de gallina, en la teca interna del folículo (Unsicker y col., 1983). Se ha propuesto que en el ovario de la rata, las catecolaminas podrían estar regulando las funciones de las células foliculares para que a su vez, estas regulen el estado metabólico del ovocito; ya que al eliminar la inervación ovárica se altera el crecimiento folicular (Burden y col., 1985; Curry y col., 1984; Lara y col., 1990; Moran y col., 2000). Se ha reportado la participación de la adrenalina y noradrenalina, en el desarrollo folicular y la ovulación; gallinas tratadas con estas catecolaminas presentaron un aumento en la tasa de ovulación y en las concentraciones de estradiol, progesterona, zinc y triglicéridos (Ebeid y col., 2008).

Para demostrar la presencia de fibras nerviosas en el ovario izquierdo de pollo se utilizó como marcador a la enolasa específica de neuronas  $\gamma$  (NSE, por su sigla en Inglés); la cual ya ha sido reportada como marcador citoplasmático de neuronas y células neuroendocrinas en ovario inmaduro de avestruz donde se han localizado fibras nerviosas positivas a NSE en la médula y en el tallo ovárico y asociadas a las células esteroideogénicas (Kimaro y Madekurozwa., 2006; Madekurozwa, 2008). En este trabajo se localizaron fibras nerviosas positivas a NSE en la médula profunda y en los ganglios intraováricos de animales en etapa embrionaria. Después de la eclosión se detectaron



fibras nerviosas marcadas con NSE asociadas a los folículos en crecimiento y a las células esteroidogénicas en el ovario de pollo.

Los resultados mostraron una distribución similar de la enzima TH con la enzima NSE; ambas se observaron en fibras nerviosas principalmente en la médula profunda y en los ganglios intraováricos hasta el momento de la eclosión. A diferencia de lo observado para los neuropéptidos, TH y NSE presentaron un marcaje intenso en la zona de la médula profunda y no hubo marcaje de estas enzimas en la zona cortical.

Las catecolaminas han sido estudiadas en el ovario de pollo y gallina donde se demostró que intervienen en el desarrollo y función gonadal en etapa embrionaria y adulta (Kao y Nalbandov., 1972; Moudgal y Razdan, 1983; Bahr y col., 1986; Unsicker y col., 1983; Müller y col., 1988). De acuerdo con lo mencionado anteriormente, proponemos que al igual que los neuropéptidos, las catecolaminas son moduladores de las funciones del ovario de pollo como la esteroidogénesis y desarrollo folicular. Solo el VIP y el NPY se encontraron en la zona de la corteza, lo cual nos podría sugerir una función distinta a las catecolaminas de estos neuromoduladores en las edades estudiadas. Los resultados obtenidos ponen en evidencia que los tractos catecolaminérgicos encontrados sobre la región medular son más abundantes que los VIPérgicos y NPYérgicos, sin embargo, es necesario aclarar si estas moléculas coexisten así como cual es su posible papel en el desarrollo de la gónada.

Conforme avanzó el desarrollo se observó que el NPY y VIP estaban distribuidos en células neurales y no neurales; sin embargo, la distribución de TH se mostró más en células neurales. La determinación del origen y la producción de NPY y VIP en el ovario, así como su posible función en células foliculares en aves es un área que requiere más estudios.

Por todo lo anterior, se puede suponer que NPY y VIP así como las catecolaminas están participando en la regulación de funciones ováricas como el crecimiento folicular y la esteroidogénesis en el ovario izquierdo del pollo. Futuros experimentos serán necesarios para determinar la participación de estos neuropéptidos y las catecolaminas en la regulación de las funciones del ovario.



## CONCLUSIONES

- ❖ Los neuropéptidos VIP y NPY así como las catecolaminas están presentes durante el desarrollo del ovario del pollo desde los 11 días de incubación y se mantienen hasta los 15 días posteclosión.

### EN EDADES EMBRIONARIAS:

- ❖ En la zona cortical, el marcaje para VIP se localizó en las células del epitelio superficial y en los tabiques que delimitan los nidos de ovocitos. En la zona medular, VIP se localizó en el citoplasma de las células esteroideogénicas, en fibras nerviosas que inervan canales lacunares, vasos sanguíneos, células esteroideogénicas y ganglios intraováricos.
- ❖ NPY se localizó en células del epitelio superficial. En la médula, se observaron fibras que inervan canales lacunares, vasos sanguíneos, cordones de células esteroideogénicas y ganglios adyacentes al ovario.
- ❖ TH se localizó principalmente en la médula profunda y en los ganglios intraováricos.

### A PARTIR DE LA ECLOSIÓN

- ❖ El marcaje para VIP se mantuvo en las células del epitelio superficial. Se observan fibras nerviosas que inervan a los folículos en crecimiento y células esteroideogénicas.
- ❖ El inmunomarcaje para NPY en el epitelio superficial se vuelve débil y a los 15 días posteclosión es imperceptible. Se observan abundantes fibras nerviosas que inervan a los folículos en crecimiento, cordones de células esteroideogénicas y vasos sanguíneos.
- ❖ La TH se encuentra en fibras nerviosas distribuidas de manera muy similar que NPY, inervando folículos en crecimiento, cordones de células esteroideogénicas y



vasos sanguíneos, aunque las fibras nerviosas positivas para TH no son tan finas como las de NPY.

- ❖ Se localizaron fibras nerviosas positivas para NSE en la médula profunda de los ovarios embrionarios y en las edades posteclosión la distribución de esta enzima se ubico en fibras nerviosas asociadas a células esteroideogénicas y folículos en crecimiento.



## BIBLIOGRAFÍA

- **Aguirre- Benítez E., Velázquez A., Mendoza M., Márquez R., González del Pliego M. (2005a).** Localización de VIP en el epitelio del ovario del pollo durante el desarrollo temprano y la foliculogénesis. Memorias de la Reunión reglamentaria de la Asociación de Investigación Pediátrica (AIP): 129-148.
- **Aguirre-Benítez E, Velázquez A, Mendoza ME, Márquez RM, González del-Pliego M. (2005b).** Distribución de VIP y catecolaminas en el ovario de pollo durante el desarrollo y la foliculogénesis postnatal. XXX Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción (AIBIR, A.C):173-203.
- **Aguirre-Benitez E. (2009).** Inmunolocalización del péptido intestinal Vasoactivo (VIP) y sustancia P (SP) en el ovario de pollo. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias.
- **Ahmed C., Dees W., Ojeda S. (1986).** The immature rat ovary is innervated by Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology.* 118:1682-1689.
- **Aisa J., Lahoz M., Serrano P., Junquera C., Peg M., Vera-Gil A. (1997).** Intrinsic innervation of the chicken lower digestive tract. *Neurochem Res.* Dec; 22(12):1425-35.
- **Allen L., Wilson F., Mcdonald G. (1989).** Neuropeptide Y-containing nerves in rat gonads: sex difference and development. *Biol Reprod.* Feb; 40(2):371-8.
- **Alm P., Alumets J., Hakanson R., Owman O., Sjoberg N., Sundler F., Walles B. (1980).** Origin and distribution of VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide- nerves in the genito-urinary tract. *Cell Tissue Res.* 205 (3):337-47.
- **Amanuma A., Yamada K. (1979).** Innervation of the ovarian interstitial cell of the chick embryo. *Experientia.* Mar 15; 35(3):403-4.
- **Ando Y., Fujimoto T. (1983).** Ultrastructural Evidence that Chick Primordial Germ Cells Leave the Blood-Vascular System Prior to Migrating to the Gonadal Anlagen. *Development: Growth and Differentiation.* 25 (4): 345-352.
- **Andrews J., Smith C., Sinclair A. (1997).** Sites of estrogen receptor and aromatase expression in the chicken embryo. *Gen Comp Endocrinol.* Nov; 108(2):182-90.
- **Aréchiga H. (1991).** Mecanismos de acción de neuropéptidos. *La Ciencia y el Hombre,* enero-abril, no. 7, p. 107-122



- **Ávila R., Samar M., De Fabro S. (1987a).** Ultrastructural changes of left and right ovaries from chick embryo. *Comun Biol* 6:1, 63-72.
- **Ávila R., Samar M., De Fabro S. (1987b).** In vitro development of the female gonads of chick embryos. *Rev. Fac. Cien. Med. Univ. Nac. Cordoba.* 45:17-20.
- **Ávila R., Samar M., De Fabro S. (1989).** Hormone induced differentiation of ovaries from chick embryo in tissue culture. *Comun. Biol.* 8, 2: 12-133.
- **Ávila R., Samar M., De Fabro S. (1991).** Interstitial cells of the ovaries of the chick embryo: ultrastructural aspects of their innervation. *Rev. Fac. Cien. Med. Univ. Nac. Cordoba (Argentina).* 49: 13-17.
- **Bahr J., Kao L., Nalbandov A. (1974).** The role of catecholamines and nerves in ovulation. *Biology of reproduction.* 10:273-290.
- **Bahr J., Ritzhaupt L., McCullough S., Arbogast L., Ben-Jonathan N. (1986).** Catecholamine content of the preovulatory follicles of the domestic hen. *Biol Reprod. Apr;* 34(3): 502-6.
- **Balen A. (2007).** *Reproductive Endocrinology.* 2da edición. Editorial RCOG PRESS. Londres. Pp. 214.
- **Barreca A., Valli B., Cesarone A., Arvigo M., Balasini M., Battista La Sala G., Garrone S., Minuto F., Giordano G. (1998).** Effects of the neuropeptide Y on estradiol and progesterone secretion by human granulosa cells in culture. *Fertil Steril. Aug;* 70(2): 320-5.
- **Bhatt R., Youngren O., Kang S., Halawani E. (2003).** Dopamine infusion into the third ventricle increases gene expression of hypothalamic Vasoactive intestinal peptide and pituitary prolactin and luteinizing hormone beta subunit in the turkey. *Gen Comp Endocrinol. Jan;* 130(1):41-7.
- **Blomqvist A., Söderberg C., Lundell I., Milner R., Larhammar D. (1992).** Strong evolutionary conservation of neuropeptide Y: sequences of chicken, goldfish, and *Torpedo marmorata* DNA clones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 15; 89(6):2350-4.
- **Bruggeman V., Van As P., Decuypere E. (2002).** Developmental endocrinology of the reproductive axis in the chicken embryo. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 131: 839–846.
- **Brunström B., Axelsson J., Mattsson A., Halldin K. (2009).** Effects of estrogens on sex differentiation in Japanese quail and chicken. *Gen Comp Endocrinol. Sep* 1;163 (1-2):97-103. Review.



- **Burden H. (1978).** Ovarian innervation. In: *The Vertebrate Ovary: Comparative Biology and Evolution.* (R E Jones, Ed.) Plenum Press, New York, pp. 615-638.
- **Burden H., Leonard M., Smith C., Lawrence I. (1983).** The sensory innervations of the ovary: a horseradish peroxidase study in the rat. *Anat Rec.* 207(4):623-7.
- **Burden H., Lawrence I., Louis T. (1985).** The adrenergic innervation of the guinea pig ovary during prenatal and postnatal periods. *Acta Anat (Basel).*122(3):193-6.
- **Burgoyne P. (1988).** Role of mammalian Y chromosome in sex determination. *Phil. Trans. R. Lond. B* 322: 63-72
- **Burns R. (1961).** Role of the hormones in the differentiation of sex. *Sex and internal secretions.* (C, W. Young Edit.) 76-151. Williams and Wilkins. Baltimore.
- **Carlson N., Stahl A. (1985).** Origin of the somatic components in chick embryonic gonads. *Archiv Anat Microsc Morphol Exper.* 74 (1): 52-59.
- **Cecconi S., Rossi G., Barberi M., Scaldaferrri L., Canipari R. (2004).** Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on mouse preantral follicle development in vitro. *Endocrinology.* Apr; 145(4):2071-9.
- **Chen N., Li Y., Wang W., Ma Y., Yang D., Zhang Q. (2013).** Vasoactive intestinal peptide can promote the development of neonatal rat primordial follicles during in vitro culture. *Biol Reprod.* Jan 17; 88(1):12.
- **Curry T Jr., Lawrence I Jr, Burden H. (1984).** Ovarian sympathectomy in the guinea pig. I. Effects on follicular development during the estrous cycle. *Cell Tissue Res.*;236(2):257-63.
- **Dahl E. (1970).** Studies of the fine structure of ovarian interstitial tissue. 3. The innervation of the thecal gland of the domestic fowl. *Zellforsch Mikrosk Anat.* 109(2):212-26.
- **Davoren JB, Hsueh AJ. (1985).** Vasoactive Intestinal Peptide: a novel stimulator of steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. *Biol Reprod.* Aug; 33(1):37-52.
- **DeFalco T., Capel B. (2009).** Gonad Morphogenesis in Vertebrates: Divergent Means to a Convergent End. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25: 19.1-19.26.
- **Dees W., Hiney J., Schultea T., Mayerhofer A., Danilchik M., Dissen G., Ojeda S. (1995).** The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors. *Endocrinology.* Dec;136(12):5760-8.



- **Dissen G., Paredes A., Romero C., Dess W., Ojeda S. (2004).** Neural and neurotrophic control of ovarian development. In Leung P, Adashi EY. The ovary. Ed Elsevier. USA 3-23.
- **Domínguez R., Zipitría D., Aguilar L., Riboni L. (1981).** Effects of unilateral destruction of the cervico-vaginal plexus on ovulation in the rat. *J Endocrinol.* Dec; 91(3):483-6.
- **Dumont Y., Martel J., Fournier A., St-Pierret S., Quirion R. (1992).** Neuropeptide Y and Neuropeptide Y receptors subtypes in brain and peripheral tissues. *Progress in Neurobiology.* 38: 125-167.
- **Ebeid T., Eid Y., El-Abd E., El-Habbak M. (2008).** Effects of catecholamines on ovary morphology, blood concentrations of estradiol-17beta, progesterone, zinc, triglycerides and rate of ovulation in domestic hens. *Theriogenology.* Apr 15; 69(7): 870-6.
- **Ekesbo R., Alm P., Ekström P., Lundberg L., Akerlund M. (1991).** Innervation of the human uterine artery and contractile responses to neuropeptides. *Gynecol Obstet Invest.;* 31(1):30-6.
- **Emson P., Lindvall O. (1979).** Distribution of putative neurotransmitters in the neocortex. *Neuroscience;* 4(1):1-30.
- **Esposito V., De Girolamo P., Gargiulo G. (1994).** Extrahypothalamic distribution of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like immunoreactivity in the chicken brain, *Gallus domesticus.* *Neuropeptides,* Oct; 27(4):225-34.
- **Esposito V, Pelagalli G, De Girolamo P, Gargiulo G. (2001).** Anatomical distribution of NPY-like immunoreactivity in the domestic chick brain (*Gallus domesticus*). *Anat Rec.* Jun 1; 263(2):186-201.
- **Fahrenkrug J. (1989).** VIP and autonomic neurotransmission. *Pharmacol Ther.* 41:515–34.
- **Fargeix N., Didier E., Didier P. (1981).** Early sequential development in avian gonads. An ultrastructural study using selective glycogen labeling in the germ cells. *Reprod Nutr Dev.* 21(3):479-96.
- **Fechheimer N. (1990).** Chromosomes of Chickens. In: McFeely RA (ed.) *Domestic Animal Cytogenetics.* Academic Press, San Diego, Calif., 169-207.
- **Galli F., Wassermann G. (1973).** Testosterone 3H metabolism by urogenital structures of 10-day-old chick embryos. *Acta Physiol Lat Am;* 23(2):148-51.



- **Garraza M., Aguado L., De Bortoli M. (2004).** In vitro effect of neuropeptides on ovary or celiac ganglion affects the release of progesterone from ovaries in the rat. *Med Sci Monit.* 2004 Dec; 10(12): 440-6.
- **George F., Ojeda S. (1987).** Vasoactive intestinal peptide enhances aromatase activity in the neonatal rat ovary before development of primary follicles or responsiveness to follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci USA.* Aug; 84(16):5803-7.
- **Gerendai I., Banczerowski P., Halász B. (2005).** Functional significance of the innervation of the gonads. *Endocrine.* Dec; 28(3):309-18. Review.
- **Getty R. (1982).** *Anatomía de los Animales*, editado por Sisson y Grossman. Ed. Salvat, México. Pp: 2121-2148.
- **Gil A. (2010).** *Tratado de nutrición IV. Nutrición clínica.* 2da edición. Editorial medica panamericana. Madrid España. Pág. 63.
- **Gilbert A. (1965).** Innervation of the ovarian follicle of the domestic hen. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci.* 50:437-45.
- **Gilbert A. (1969).** Innervation of the ovary of the domestic hen. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci.* Oct; 54(4):404-11.
- **Gilbert S. (2000).** *Developmental Biology.* 6 edition. Sinauer Associates, Inc., publishers. USA. Chapter 19: 585-617.
- **Gómez C., Hernández G., Rojas A., Santacruz H., Uribe M. (2008).** *Psiquiatría Clínica.* Ed. Médica Panamericana. 3era edición. 848 páginas
- **Gómez Y., Velázquez P., Peralta-Delgado I., Méndez M., Vilchis F., Juárez-Oropeza M., Pedernera E. (2001).** Follicle-stimulating hormone regulates steroidogenic enzymes in cultured cells of the chick embryo ovary. *Gen Comp Endocrinol.* Mar; 121(3):305-15.
- **González del Pliego M., González-Morán G., Pedernera E. (1988).** Ultrastructure of the ovarian medulla in the newly hatched chick treated with human chorionic gonadotropin. *Cell Tissue Res.* Sep;253(3):665-70.
- **Goridis C., Rohrer H. (2002).** Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat Rev Neurosci.* Jul; 3(7):531-41.
- **Gozes I., Tsafiriri A. (1986).** Detection of vasoactive intestinal peptide-encoding messenger ribonucleic acid in rat ovaries. *Endocrinology* 119: 2606-2609.



- **Greiner M., Paredes A., Rey-Ares V., Saller S., Mayerhofer A., Lara H. (2008).** Catecholamine uptake, storage, and regulated release by ovarian granulosa cells. *Endocrinology*. Oct; 149(10): 4988-96.
- **Hernández M. (2002).** Motivación animal y humana. Ed. El manual moderno. Mexico DF, pp 434.
- **Henning R., Sawmiller D. (2001).** Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects. Review. *Cardiovascular Research* 49: 27–37.
- **Hökfelt T., Broberger C., Xu Z., Sergeev V., Ubink R., Diez M. (2000).** Neuropeptides an overview. *Neuropharmacology*. Jun 8; 39(8): 1337-56.
- **Holmgren S., Jensen J. (2001).** Evolution of the Nervous System. Evolution of vertebrate neuropeptides *Brain Research Bulletin*, 55(6): 723–735.
- **Hulshof S., Dijkstra G., Van der Beek E., Bevers M., Figueiredo J., Beckers J., Van den Hurk R. (1994).** Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and neuropeptide Y in the bovine ovary. *Biology of Reproduction* 50: 553-560.
- **Jana B., Dzienis A., Wojtkiewicz J., Kaczmarek M., Majewski M. (2007).** Surgical denervation of porcine ovaries during the middle luteal phase of the oestrous cycle changes their morphology and steroidogenic activity. *Acta Vet Hung*. Mar; 55(1): 107-22.
- **Johnson A., Tilly J. (1988).** Effects of vasoactive intestinal peptide on steroid secretion and plasminogen activator activity in granulosa cells of hen. *Biol Reprod*. 38(2):296-303.
- **Johnson A., Li Z., Gibney J., Malamed S. (1994).** Vasoactive intestinal peptide-induced expression of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage and 17 $\alpha$ -hydroxylase enzyme activity in hen granulosa cells. *Biol Reprod* 51: 327-333.
- **Jorgensen J., Sheikh S., Forman A., Norgard M., Schwartz T., Ottesen B. (1989).** Neuropeptide Y in the human female genital tract: localization and biological action. *Am J Physiol*. 1989 Aug; 257(2 Pt 1):E220-7.
- **Jorgensen J., Sejrsen P. (1990).** Neuropeptide Y reduces ovarian blood flow in the rabbit. *Peptides*. May-Jun; 11(3):451-4.
- **Jorgensen J., Giwercman A., Ottesen B. (1996).** Neuropeptide Y in the human prenatal and mature gonads. *Neuropeptides*. Jun; 30(3): 293-301.
- **Kannisto P., Ekblad E., Helm G., Owman C., Sjöberg N., Stjernquist M., Sundler F., Walles B. (1986).** Existence and coexistence of peptides in nerves of



the mammalian ovary and oviduct demonstrated by immunocytochemistry. *Histochemistry*. 86 (1):25-34.

- **Kao L., Nalbandov A. (1972).** The effect of antiadrenergic drugs on ovulation in hens. *Endocrinology*. May; 90(5):1343-9.
- **Kawashima M., Takahashi T., Yasuoka T., Kamiyoshi M., Tanaka K. (1995).** A vasoactive intestinal peptide binding component in hen granulosa cells. *Proc Soc Exp Biol Med*. Sep; 209(4): 387-91.
- **Keator C., Custer E., Hoagland T., Schreiber D., Mah K., Lawson A., Slayden O., McCracken J. (2010).** Evidence for a potential role of neuropeptide Y in ovine corpus luteum function. *Domest Anim Endocrinol*. Feb; 38(2): 103-14.
- **Kimaro W., Madekurozwa M. (2006).** Immunoreactivities to protein gene product 9.5, neurofilament protein and neuron specific enolase in the ovary of the sexually immature ostrich (*Struthio camelus*). *Exp Brain Res* (2006) 173: 291–297
- **Kowalewski M., Dyson M., Boos A., Stocco D. (2010).** Vasoactive intestinal peptide (VIP)-mediated expression and function of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 328: 93-103.
- **Krieger D. (1986).** An overview of neuropeptides. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*. 64:1-32.
- **Lara H., McDonald J., Ahamed C., Ojeda S. (1990).** Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinol* 127:1299-2209.
- **Lara H., Dees W., Hiney J., Dissen G., Rivier C., Ojeda S. (1991).** Functional recovery of the developing rat ovary after transplantation: contribution of the extrinsic innervation *Endocrinol* 129:1849-1860.
- **Larsson L., Fahrenkrug J., Schaffalitzky de Muckadell O. (1977).** Vasoactive intestinal polypeptide occurs in nerves of the female genitourinary tract. *Science*. 197: 1374–1375.
- **Lévesque D., Diaz J., Pilon C., Martres M., Giros B., Souil E., Schott D., Morgat J., Schwartz J., Sokoloff P. (1992).** Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7-[3H]hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin. *Proc Natl Acad Sci USA* Sep 1;89(17):8155-9.
- **López C., Bartulos O., Martínez E., Gañan C., Valenciano A., García V. (2010).** Tyrosine Hydroxylase is expressed during early heart development and is required for cardiac chamber formation. *Cardiovascular Research* 88: 111-120.



- **Lundell I., Boswell T., Larhammar D. (2002).** Chicken neuropéptido Y-family receptor Y4: a receptor with equal affinity for pancreatic polypeptide, neuropéptido Y and peptide YY. *Journal of molecular Endocrinology* 28: 225-235.
- **Madekurozwa M. (2008).** An immunohistochemical study of ovarian innervation in the emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 75: 59–65.
- **Magni P., Vettor R., Pagano C., Calcagno A., Martini L., Motta M. (2001).** Control of the expression of human neuropeptide Y by leptin: in vitro studies. *Peptides*. 22: 415- 420.
- **Majewski M., Heym C. (1991).** The origin of ovarian neuropeptide Y (NPY)-immunoreactive nerve fibres from the inferior mesenteric ganglion in the pig. *Cell Tissue Res*. Dec; 266(3): 591-6.
- **Manríquez R. (2010).** Identificación del receptor de NPY en el sistema inmune de *Salmo salar*: análisis de su expresión y participación en la actividad de leucocitos. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias.
- **Mardomingo M. (1994).** Psiquiatría del niño y del adolescente ediciones Díaz de Santos S.A. Madrid Pág. 117-120.
- **Markiewicz W., Jaroszewski J., Barszczewska B., Sienkiewicz W. (2003a).** Localization of neuropeptide Y and norepinephrine in the porcine ovarian artery and their influence on the local blood pressure. *Folia Histochem Cytobiol*. 41(2): 73-81.
- **Markiewicz W., Jaroszewski J., Bossowska A., Majewski M. (2003b).** NPY: its occurrence in relevance in the female reproductive system. *Folia Histochem Cytobiol*. 41(4):183-92.
- **Maseki Y., Nakamura K., Iwasawa A., Zheng J., Inoue K., Sakai T. (2004).** Development of gonadotropes in the chicken embryonic pituitary gland. *Zoolog Sci*. Apr; 21(4):435-44.
- **Mayer R., Walker J. (1990).** Immunochemical methods in cell and molecular biology. Methods and application. Academic press. Pp.259-286. CRC Press, Boca Ratón, FL. Pág 304.
- **Mayerhofer A., Dissen G., Costa M., Ojeda S. (1997).** A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinol* 138(8): 3320-3329.



- **Mayerhofer A., Smith G., Danilchik M., Levine J., Wolf P., Dissen G., Ojeda S. (1998).** Oocytes are source of catecholamines in the primate ovary: evidence for cel-cell regulatory loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10990-10995.
- **McDonald J., Dees W., Ahmed C., Noe B., Ojeda S. (1987).** Biochemical and immunocytochemical characterization of neuropeptide Y in the immature rat ovary. *Endocrinology*. May; 120(5):1703-10.
- **McDonald J. (1990).** Role of neuropeptide Y in reproductive function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 611: 258–272.
- **Morán C., Morales L., Quiróz U., Domínguez R. (2000).** Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in infantile rats on follicular growth. *J. Endocrinol.* Jul; 166(1): 205-11.
- **Moshin S., Pennefather J. (1979).** The sympathetic innervation of the mammalian ovary. A review of pharmacological and histological studies. *Clin. Exp. Pharmacol Physiol*; 6(3):335-54.
- **Moudgal R., Razdan M. (1983).** Catecholamines in ovarian follicles during the ovulatory cycle of White Leghorn hens. *Br Poult Sci.* Apr; 24(2):173-6.
- **Müller U., Grothe C., Kaveri S., Strosberg A., Verhofstad A., Unsicker K. (1988).** Catecholaminergic nerves in the embryonic chick ovary: co-localization with  $\beta_2$ -adrenoceptor-bearing steroidogenic cells. *Cell Tissue Res* 254:1-9.
- **Mutt V., Said S. (1974).** Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide. The amino acid sequence. Use of kallikrein in its determination. *Eur J Biochem.* 42: 581–589.
- **Nakabayashi O., Kikuchi H., Kikuchi T., Mizuno S. (1998).** Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *J Mol Endocrinol.* Apr; 20(2):193-202.
- **Narbaitz R., De Robertis E. (1970).** Steroid-producing cells in chick intersexual gonads. *Gen Comp Endocrinol.* Feb;14(1):164-9.
- **Nili H., Kelly W. (1996).** Form and function of lacunae in the ovary of the laying hen. *Anat Rec.* Feb; 244(2):165-74.
- **Nishikimi H., Kansaku N., Saito N., Usami M., Ohno Y., Shimada K. (2000).** Sex differentiation and mRNA expression of P450c17, P450arom and AMH in gonads of the chicken. *Mol Reprod Dev.* Jan;55(1):20-30.



- **Ojeda S., Costa M., Katz K., Hersh L. (1985).** Evidence for the existence of substance P in the prepubertal rat ovary. I. Biochemical and physiologic studies. *Biol. Reprod.* 33:286-295.
- **Ojeda S., Urbanski H., Ahmed C. (1986).** The onset of female puberty: studies in the rat. *Recent Prog Horm Res.* 42:385-442.
- **Oliveros L., Forneris M., Aguado L. (2001).** Secretion from neuropeptide-treated splenocytes modifies ovarian steroidogenesis. *Medicina (B Aires);* 61(1):35-40
- **Ottinger M. (1989).** Sexual differentiation of neuroendocrine systems and behavior. *Poult Sci.* Jul; 68(7):979-89.
- **Palle C., Bredkjaer H., Fahrenkrug J., Ottesen B. (1991).** Vasoactive intestinal neuropeptide loses its ability to increase vaginal blood flow after menopause. *Am J. Obstet Gynecol.* 164(2): 556-558.
- **Papka R., Cotton J., Taurig H. (1985).** Comparative distribution of neuropeptide tyrosine-, vasoactive intestinal polypeptide-, substance P-immunoreactive, acetylcholinesterase-positive and noradrenergic nerves in the reproductive tract of the female rat. *Cell Tissue Res;* 242(3): 475-90.
- **Pedernera E., Gómez Y., Velázquez P., Juárez-Oropeza M., González del Pliego M. (1988).** Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. *Gen Comp Endocrinol.* Jul; 71(1):153-62.
- **Pedrazzini T., Pralong F., Grouzmann E. (2003).** Neuropeptide Y: the universal soldier. *Cell Mol Life Sci.* 60: 350-77.
- **Pitzel L., Jarry H., Wuttke W. (1991).** Effects of substance-P and neuropeptide-Y on in vitro steroid release by porcine granulosa and luteal cells. *Endocrinology.* Aug; 129(2): 1059-65.
- **Puebla N., Proudman J., Compton A., Clements K., Decuypere E., Vandesande F., Berghman L. (2002).** FSH- and LH-cells originate as separate cell populations and at different embryonic stages in the chicken embryo. *Gen Comp Endocrinol.* Jul; 127(3): 242-8.
- **Recabarren S., Muñoz P, Lobos A, Vilches C, Parilo J. (2006).** Análogo de GnRH disminuye la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) en ovejas prepúberes. *Arch. Med. Vet.* 38, N° 1.
- **Rey-Ares V., Lazarov N., Berg D., Berg U., Kunz L., Mayerhofer A. (2007).** Dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol.* Oct 25; 5:40.



- **Rodríguez E., Velázquez P., Juárez M., Pedernera E. (1996).** Steroid metabolism in theca externa cells from preovulatory follicles of domestic hen (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol.* Feb 101(2): 173-9.
- **Romanoff A. (1960).** *The Avian Embryo. Structural and functional development.* Editorial Macmillan, New York, 1305 pp.
- **Said S., Mutt V. (1970).** Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science.* 169: 1217–1218.
- **Sauveur B. (1992).** *Reproducción de las aves.* Ediciones Mundi-Prensa. España. Cáp. II. Pp. 37-50.
- **Scheib D., Baulieu E. (1981).** Inhibitory effects of tamoxifen on the normal differentiation of the female gonads of the quail embryo. *C R Seances Acad Sci III.* 293(9): 513-8.
- **Serra J. (2006).** *Tratado de dolor neuropático.* Edit. Médica Panamericana. España. Pp. 89-90.
- **Singh V., Chaube R., Chourasia T., Joy K. (2010).** Temporal and periovulatory changes in ovarian catecholamines in the catfish *Heteropneustes fossilis*. *Gen Comp. Endocrinol.* Aug 1; 168(1):46-54. Epub 2010 Apr. 23.
- **Smith C., Sinclair A. (2004).** Sex determination: Insights from the chicken. *Review. Bioassays* 26: 120-132.
- **Sokolowski M. (2003).** NPY and the regulation of behavioral development. *Neuron.* 39: 6-8.
- **Spicer L. (1986).** Catecholaminergic regulation of ovarian function in mammals: current concepts. *Life Sci.* Nov 10; 39(19):1701-11.
- **Stjernquist M., Emson P., Owman C., Sjöberg N., Sundler F., Tatemoto K. (1983).** Neuropeptide Y in the female reproductive tract of the rat. Distribution of nerve fibres and motor effects. *Neurosci Lett.* 39(3): 279-84.
- **Stojilkovic S., Chang J., Izumi S., Tasaka K., Catt K. (1988).** Mechanisms of secretory responses to gonadotropin-releasing hormone and phorbol esters in cultured pituitary cells. Participation of protein kinase C and extracellular calcium mobilization. *J Biol Chem.* Nov 25; 263(33): 17301-6.
- **Strand F. (1999).** *Neuropeptides: regulators of physiological processes.* Editorial M.I.T. PRESS. Pp. 43-64.



- **Sturkie P., Poorvin D. (1973).** The avian neurotransmitter. *Proc Soc Exp Biol Med.* Jul; 143(3): 644-6.
- **Sundblad V., Bussmann L., Chiauzzi V., Pancholi V., Charreau E. (2006).**  $\alpha$ -enolase: a novel autoantigen in patients with premature ovarian failure. *Clinical Endocrinology.* 65: 745–751.
- **Suzuki M., Ohmori Y., Watanabe T., Nagatsu I. (1994).** Immunohistochemical studies on the intestinal nerve of Remak in the male chicken. *J Auton Nerv Syst.* Nov; 49(3):207-16.
- **Swift C. (1915).** Origin of the definitive sex-cells in the female chick and their relation to the primordial germ-cells. *American Journal of Anatomy* 18(3): 441-470.
- **Tenmoku S., Ottesen B., O'Hare M., Sheikh S., Bardrum B., Hansen B., Walker B., Murphy R., Schwartz T. (1988).** Interaction of NPY and VIP in regulation of myometrial blood flow and mechanical activity. *Peptides.* Mar-Apr; 9(2):269-75.
- **Tinikul Y., Mercier A., Sobhon P. (2009).** Distribution of dopamine and octopamine in the central nervous system and ovary during the ovarian maturation cycle of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Tissue Cell.* Dec; 41(6):430-42.
- **Trzeciak W., Ahmed C., Simpson E., Ojeda S. (1986).** Vasoactive intestinal peptide induces the synthesis of the cholesterol side-chain cleavage enzyme complex in cultured rat ovarian granulosa cells *Proc Natl Acad Sci USA.* Oct; 83(19): 7490-4.
- **Tur R., Herrero J., Graña M. (2010).** Amenorrea central editorial medica panamericana Madrid España. Pág. 57.
- **Unsicker K., Seidel F., Hofmann H., Müller T., Schmidt R., Wilson A. (1983).** Catecholaminergic innervation of the chicken ovary. With special reference to the follicular wall. *Cell Tissue Res;* 230(2): 431-50.
- **Van Nassauw L., Harrison F., Callebaut M. (1994).** Contractile activity of ovarian follicles in birds. *Assis Reprod Tech Androl* 6(1, 2): 113-127.
- **Velázquez P., Gómez Y., González del Pliego M., Pedernera E. (1991).** Steroidogenic cell subpopulations obtained from the theca of preovulatory follicles in the ovary of the domestic fowl. *Gen Comp Endocrinol.* Aug;83(2): 243-8.
- **Vélez H., Rojas W., Borrero J., Restrepo J. (2004).** *Endocrinología: Fundamentos de medicina* Edit. Corporación para investigaciones Biológicas. 6ta edición. Colombia. Pág. 174,175.



- **Venzke W. (1954).** The morphogenesis of the indifferent gonad of chicken embryos. *Am J Vet Res.* Apr; 15(55): 300-8.
- **Villalpando I., Sánchez G., Sánchez I., Pedernera E., Villafán H. (2000).** The P450 aromatase (P450 arom) gene is asymmetrically expressed in a critical period for gonadal sexual differentiation in the chick. *Gen Comp Endocrinol.* Mar; 117(3): 325-34.
- **Weniger J., Chouraqui J., Zeis A. (1990).** Pituitary control of estrogen secretion in the chick embryo: true or spurious? *Gen Comp Endocrinol.* 79: 346-350.
- **Witschi E. (1959).** Age of sex-determining mechanisms in vertebrates. *Science.* Aug 14; 130(3372): 372-5.
- **Woods J., Ertón L. (1978).** The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol.* Nov; 36(3): 360-70.
- **Woods J., Thommes R. (1984).** Ontogeny of hypothalamo adenohipofyseal-gonadal (HAG) interrelationships in the chick embryo. *J Exp Zool.* Dec; 232(3): 435-41.
- **Yanagisawa R., LeRoith D. (2007).** síndrome metabólico. *Clínicas medicas de Norteamérica.* Vol. 91. Número 6. Editorial Saunders Elsevier masson. España. Pág. 1243.
- **Yoshida K., Shimada K., Saito N. (1996).** Expression of P450(17 alpha) hydroxylase and P450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation. *Gen Comp Endocrinol.* May; 102(2): 233-40.
- **Zhang X., Shi T., Holmberg K., Landry M., Huang W., Xiao H., Ju G., Hökfelt T. (1997).** Expression and regulation of the neuropeptide Y Y2 receptor in sensory and autonomic ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 94: 729-734.
- **Zukowska Z., Pons J., Lee E., Li L. (2003).** Neuropeptide Y: a new mediator linking sympathetic nerves, blood vessels and immune system? *Can J Physiol Pharmacol.* 81: 89-94.