

# VNIVERSITAT VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLÓGÍA



## EFECTO BIOLÓGICO DE LA FSH RECOMBINANTE DE CODORNIZ COMÚN EN LA INDUCCIÓN DEL CICLO OVÁRICO EN AVES

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

**IGNACIO GIMÉNEZ NEBOT**

DIRIGIDA POR:

**DR. MIGUEL A. ASENSI MIRALLES**  
**DR. JULIÁN CARRETERO ASUNCIÓN**  
**DR. SALVADOR MENA MOLLÁ**

VALENCIA, OCTUBRE DE 2018



D **Miguel Ángel Asensi Miralles**, Catedrático del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València

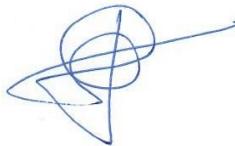
D **Julián Carretero Asunción**, Titular del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València

D **Salvador Mena Mollá**, Profesor Ayudante Doctor del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València

**CERTIFICA/N:**

Que la presente memoria, titulada "**Efecto biológico de la FSH recombinante de codorniz común en la inducción del ciclo ovárico en aves**", corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D **Ignacio Giménez Nebot**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firma/n el presente certificado en Valencia, a 18 de octubre de 2018.



Fdo. Miguel Ángel Asensi Miralles Fdo. Julián Carretero Asunción Fdo. Salvador Mena Mollá



## Dedicatoria

Al Dr. D. Félix Rodríguez de la Fuente, mi maestro.



## Agradecimientos

A los Dres. Miguel Asensi, Julián Carretero y Salvador Mena, directores de mi tesis doctoral. Por animarme a escribirla. Por sus consejos y críticas en la redacción. Por su ayuda, enseñanza y compañía en el laboratorio desde hace tantos años...Y, sobre todo, por su paciencia y afectuoso trato.

A los Dres. Joan Cerdá, Ana Gómez, Carlos Simón, M<sup>a</sup> José Izquierdo, M<sup>a</sup> Carmen Gómez y Francisco A. García, revisores de esta tesis. Por su esfuerzo, su constructiva crítica y sus sugerencias.

A D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup>. Isabel Blanch, por su amable apoyo en los asuntos administrativos.

Al Dr. D. Juan Ignacio Imbaud, por su colaboración en el desarrollo de las gonadotropinas recombinantes.

A la Dra. D<sup>a</sup>. Lucía Casares. Por su inestimable trabajo y ayuda en los experimentos de esta tesis y en los posteriores, en condiciones no siempre fáciles y propicias.

A Sofía Sansano. Por su esfuerzo y dedicación en los ensayos con animales y en la recolección de hipófisis.

A Jordi Aragonés. Por descubrirme la medicina reproductiva y por ser fiel apoyo tanto en mis años de MIR como en los que vinieron después.

A todas aquellas personas que, de un modo u otro, contribuyeron a la materialización de esta tesis.

Y a todos los pájaros que nos acompañaron en los días de búsqueda de conocimiento.



ÍNDICE .....	9
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES .....	11
ÍNDICE DE FIGURAS.....	15
ÍNDICE DE TABLAS .....	17
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....	19
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>23</b>
1.1. AVES AMENAZADAS DE EXTINCIÓN. IMPORTANCIA DE LA REPRODUCCIÓN EN CAUTIVIDAD.....	25
1.2. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA EN AVES .....	28
1.2.1. <i>Eje hipotálamo hipofisario</i> .....	28
1.2.2. <i>Gonadotropinas en aves</i> .....	37
1.2.3. <i>Fisiología ovárica en aves</i> .....	41
1.2.4. <i>Formación del huevo y oviposición</i> .....	65
1.2.5. <i>Fecundación</i> .....	68
1.3. ANTECEDENTES EN INDUCCIÓN DEL DESARROLLO FOLICULAR OVÁRICO Y OVULACIÓN EN AVES MEDIANTE GONADOTROPINAS .....	71
1.4. GONADOTROPINAS RECOMBINANTES.....	78
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>83</b>
2.1. INTRODUCCIÓN .....	85
2.2. HIPÓTESIS .....	86
2.3. OBJETIVOS .....	87
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>89</b>
3.1. MATERIALES .....	91
3.1.1. <i>Animales</i> .....	91
3.1.2. <i>Hormonas comerciales</i> .....	93
3.2. MÉTODOS.....	94
3.2.1. <i>Obtención de anticuerpos anti-βFSH, anti-βLH y anti-α-sub de codorniz</i> .....	94
3.2.2. <i>Obtención de FSH recombinante de codorniz (ccrFSH)</i> .....	120
3.2.3. <i>Purificación de hormonas hipofisarias</i> .....	138
3.2.4. <i>Ensayo in vitro</i> .....	144

3.2.5. Administración de los tratamientos <i>in vivo</i> .....	149
3.2.6. Necropsia y medición de folículos ováricos y oviducto.....	150
3.2.7. Ecografía .....	150
3.2.8. Inseminación artificial. ....	151
3.2.9. Incubación.....	152
3.2.10. Mantenimiento de los pichones .....	153
3.2.11. Sexado molecular de aves .....	153
3.2.12. Análisis estadístico .....	156
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>157</b>
4.1. ACTIVIDAD BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DE CCRFSH, TPE, LH IEX Y ECG.....	159
4.2. EFECTO BIOLÓGICO DE CCRFSH <i>IN VIVO</i> EN CODORNIZ.....	165
4.3. EFECTO BIOLÓGICO DEL TRATAMIENTO COMBINADO CON CRFSH Y LH IEX <i>IN VIVO</i> EN CODORNIZ..	172
4.4. EFECTO BIOLÓGICO DE CCRFSH Y ESTRADIOL <i>IN VIVO</i> EN CODORNIZ .....	182
4.5. EFECTO BIOLÓGICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE CCRFSH Y ECG <i>IN VIVO</i> EN CODORNIZ .....	186
4.5.1. Administración de ccrFSH (1 µg) en combinación con 10 UI eCG.....	187
4.5.2. Efecto de la reducción de dosis de ccrFSH y eCG .....	194
4.6. INDUCCIÓN DEL CICLO REPRODUCTIVO EN PALOMA BRAVÍA MEDIANTE CCRFSH Y ECG.....	202
4.6.1. Evaluación de la actividad biológica de eCG y EGP en paloma .....	203
4.6.2. Inducción del ciclo ovárico en paloma bravía mediante ccrFSH y eCG. ....	212
4.6.3. Inducción del ciclo ovárico en paloma mediante tratamiento individualizado con ccrFSH y eCG.....	220
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>239</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>243</b>

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

---

Ilustración 1. Esquema representativo del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal en aves. ....	29
Ilustración 2. Representación esquemática de fisiología neuroendocrina de la reproducción en aves .....	36
Ilustración 3. Aspecto macroscópico del ovario de codorniz.....	45
Ilustración 4. Imagen representativa de las poblaciones foliculares ováricas de gallina.....	49
Ilustración 5. Imagen representativa de las poblaciones foliculares ováricas de codorniz y paloma.....	50
Ilustración 6. Selección folicular en gallina.....	52
Ilustración 7. Esquema representativo de la variación de FSHR y LHR en células de la granulosa de folículos ováricos preovulatorios durante su proceso de crecimiento y maduración. ....	56
Ilustración 8. Modelos de esteroidogénesis ovárica en mamíferos y aves. ...	60
Ilustración 9. Imagen ilustrativa de los mecanismos reguladores de la oleada de LH y ovulación en mamíferos y aves. ....	64
Ilustración 10. Imagen del sistema de baterías para alojamiento de palomas.....	93
Ilustración 11. Esquema de los vectores del sistema Gateway® (Invitrogen) .....	96
Ilustración 12. Esquema ilustrativo de la subclonación en pDEST™17.....	97

Ilustración 13. Secuencia nucleotídica y aminoacídica resultante tras recombinación en pDEST <sup>TM</sup> 17.....	99
Ilustración 14. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR $\beta$ -FSH.....	109
Ilustración 15. Electroforesis en gel de agarosa del vector pDEST17 e inserto 6XHis- $\beta$ -LH .....	109
Ilustración 16. Tinción con Azul de Coomassie de geles de electroforesis. Subunidades gonadotropinas. ....	116
Ilustración 17. Tinción con Azul de Coomassie y <i>Western blotting</i> de 6XHis- $\beta$ -FSH.....	119
Ilustración 18. Esquema del gen sintético ccrFSH.....	120
Ilustración 19. Esquema del vector pcDNA3.1. Sitio de subclonación de ccrFSH.....	122
Ilustración 20. Electroforesis en gel de agarosa. Digestión HindIII y EcoRI de pcDNA3.1(+) .....	123
Ilustración 21. Electroforesis en gel de agarosa. Digestión <i>HindIII</i> / <i>EcoRI</i> del vector suministrado por el proveedor .....	123
Ilustración 22. Electroforesis en gel de agarosa tras digestión de pcDNA3.1_ccrFSH .....	124
Ilustración 23.Producto de PCR (ccrFSH) a partir de colonia tras transformación con pcDNA3.1_ccrFSH.....	128
Ilustración 24. Electroforesis en gel de agarosa de pcDNA3.1 purificado. .	133
Ilustración 25. <i>Western blotting</i> seguimiento expresión ccrFSH. ....	135
Ilustración 26. Tinción con Azul de Coomassie y <i>Western blotting</i> de ccrFSH.....	137
Ilustración 27. Cromatograma obtenido en cromatografía de intercambio iónico a partir de extracto glicoproteico de adenohipofisis de pavo.....	142

Ilustración 28. <i>Western blotting</i> de las fracciones cromatográficas tras incubación con anti- $\beta$ -FSH y anti- $\beta$ -LH.....	143
Ilustración 29. Jerarquía folicular (F1-F6) en gallina ponedora.....	145
Ilustración 30. Capa granulosa recién desprendida de un folículo F1 de gallina.....	146
Ilustración 31. Espermatozoides de paloma bravía tras dilución 1:40 en suero fisiológico.....	152
Ilustración 32. Aspecto macroscópico de los ovarios de las codornices de los grupos Control y tratadas con ccrFSH (0,8 $\mu$ g).....	167
Ilustración 33. Aspecto macroscópico de los ovarios de los individuos tratados con ccrFSH o LH IEX de forma aislada y grupo Control.....	174
Ilustración 34. Aspecto macroscópico de ovarios y oviductos del grupo tratado con ccrFSH (1 $\mu$ g) + LH IEX (34 $\mu$ g).....	176
Ilustración 35. Aspecto macroscópico de los ovarios y oviductos de codornices inmaduras tratadas durante dieciocho días con ccrFSH + 10 UI eCG.....	190
Ilustración 36. Aspecto ecográfico de folículos ováricos en paloma tras administración de EGP.....	209
Ilustración 37. Imagen ecográfica de folículo ovárico en paloma tras administración de ccrFSH + eCG (Grupo B). Día 13 <sup>o</sup> de tratamiento. Diámetro folicular = 14,5 mm.....	214
Ilustración 38. Imagen ecográfica del huevo intraoviductal (dos yemas) en el individuo P19 durante la exploración del día 13 <sup>o</sup> de tratamiento.....	217
Ilustración 39. Imagen ecográfica de folículos ováricos tras tratamiento combinado con ccrFSH y eCG.....	219

Ilustración 40. Ovoscopia durante el 6º día de incubación del huevo con dos yemas puesto por el individuo P46 el día 13º de tratamiento .....	229
Ilustración 41. Imagen ecográfica de huevos intraoviductales .....	233
Ilustración 42. Aspecto macroscópico de embriones muertos in ovo tras 21 días de incubación.....	235
Ilustración 43. Imagen ovoscópica y fotografía de los pichones nacidos durante este ensayo.....	236
Ilustración 44. Sexado molecular de pichones. Electroforesis en gel de agarosa.....	237

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las subunidades beta de FSH de codorniz, pavo, pollo y paloma. ....	39
Figura 2. Análisis por tinción con Azul de Coomassie de las fracciones de la purificación por intercambio iónico.....	143
Figura 3. Análisis por tinción con Azul de Coomassie y <i>Western blotting</i> de las fracciones EGP, LH IEX y FSH IEX obtenidas a partir de adenohipófisis de pavo.....	144
Figura 4. Secreción de progesterona por células de la granulosa F5 tras incubación con gonadotropinas .....	161
Figura 5. Secreción de progesterona por células de la granulosa F1 tras incubación con gonadotropinas .....	163
Figura 6. Folículos ováricos $\geq 1$ mm tras tratamiento con ccrFSH en codorniz.....	166
Figura 7. Folículos ováricos en categorías de 1-2 mm y 2-4 mm tras tratamiento con ccrFSH.....	168
Figura 8. Peso ovárico y oviductal tras tratamiento con ccrFSH .....	169
Figura 9. Folículos ováricos de diámetro $\geq 1$ mm tras tratamiento con ccrFSH y LH IEX .....	173
Figura 10. Folículos ováricos agrupados por categorías según diámetro folicular tras tratamiento con ccrFSH y LH IEX .....	175
Figura 11. Peso ovárico y oviductal tras tratamiento con ccrFSH y LH IEX.....	176
Figura 12. Folículos ováricos de diámetro $\geq 1$ mm tras tratamiento con ccrFSH y benzoato de estradiol.....	183

Figura 13. Peso ovárico y oviductal tras tratamiento con ccrFSH y benzoato de estradiol.....	184
Figura 14. Folículos ováricos de diámetro $\geq 1$ mm tras tratamiento con ccrFSH y 10 UI eCG .....	188
Figura 15. Folículos ováricos agrupados por diámetro folicular (1-5 y 5-16,73 mm) tras tratamiento con ccrFSH y 10 UI eCG.....	189
Figura 16. Peso oviductal tras tratamiento con ccrFSH (1 $\mu$ g) y 10 UI eCG.....	192
Figura 17. Folículos ováricos de diámetro $\geq 1$ mm tras tratamiento con ccrFSH y eCG.....	196
Figura 18. Folículos ováricos agrupados por diámetro folicular tras tratamiento con ccrFSH y eCG .....	197
Figura 19. Oviposiciones y huevos intraoviductales tras tratamiento con ccrFSH y eCG.....	199
Figura 20. Media de folículos ováricos por individuo medidos mediante ecografía y necropsia en Grupo B. ....	207
Figura 21. Media del diámetro folicular máximo medido en cada individuo mediante ecografía y tras necropsia en Grupo B.....	208
Figura 22. Peso ovárico y oviductal tras tratamiento con eCG en paloma..	211
Figura 23. Folículos ováricos de diámetro $\geq 10$ mm en palomas tras tratamiento combinado con ccrFSH (0,7 ó 0,35 $\mu$ g) y 15 UI eCG/48 h .....	214
Figura 24. Media del diámetro folicular máximo en palomas tras tratamiento combinado con ccrFSH (0,7 ó 0,35 $\mu$ g) y 15 UI eCG/48 h .....	215

## ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1. Tabla de oligonucleótidos utilizados para obtención de B1-ADNc-B2.....	98
Tabla 2. Mezcla de PCR para generación de inserto a subclonar en pDONR221 .....	101
Tabla 3. Programación termociclador para PCR para generación de inserto a subclonar en pDONR221 .....	101
Tabla 4. Mezcla de PCR para selección de colonias portadoras de pDONR_221_Subunidad.....	104
Tabla 5. Rendimientos en proteínas recombinantes por litro de cultivo bacteriano .....	113
Tabla 6. Composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE. ....	114
Tabla 7. Protocolo de inmunización para la obtención de anticuerpos policlonales frente a subunidades de gonadotropinas. ....	117
Tabla 8. Composición solución para digestión de plásmidos eucariotas. ...	125
Tabla 9. Composición solución de ligación para ccrFSH/pcDNA3.1(+). ....	126
Tabla 10. Composición solución PCR para comprobación del inserto ccrFSH.....	127
Tabla 11. Rendimiento tras purificación de ccrFSH a partir de 1 l de cultivo. ....	137
Tabla 12. Rendimiento proteico de fracciones purificadas a partir de adenohipófisis de pavo (método de Bradford) .....	141
Tabla 13. Mezcla de PCR para sexado molecular de aves .....	155
Tabla 14. Programación termociclador PCR para sexado molecular .....	155

Tabla 15. Tabla de oviposiciones en codornices tratadas con ccrFSH + LH IEX .....	179
Tabla 16. Tabla de oviposiciones en codornices tratadas con ccrFSH + 10 UI eCG. ....	191
Tabla 17. Tabla de oviposiciones en codornices tratadas con ccrFSH + eCG.....	198
Tabla 18. Tabla descriptiva de muestreos durante tratamiento con ccrFSH y eCG en paloma .....	224
Tabla 19. Evolución ecográfica de folículos no ovulados .....	231

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

---

6XHis	Polihistidina (6)
A	Adenina
AC	Adenilato ciclasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMH	Hormona antimulleriana
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	ARN de transferencia
AVP	Arginina vasopresina
AVT	Arginina vasotocina
BE2	Benzoato de estradiol
BMP	Proteína morfogenética ósea
C	Citosina
CAP	Polvo de adenohipófisis de pollo
cGnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas de pollo
CHD	Cromo helicasa D
CHO	Células de ovario de hámster chino
CO <sub>3</sub> Ca	Carbonato cálcico
CTP	Péptido carboxilo terminal
CYP11A	Colesterol desmolasa
CYP17	17- $\alpha$ -hidroxilasa

CYP19	Aromatasa
Da	Dalton
<i>Dio2</i>	Deiodinasa tipo 2
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
eCG	Gonadotropina coriónica equina
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGP	Extracto glicoproteico de pavo
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción asociado a enzimas
ER $\alpha$	Receptor estrogénico $\alpha$
F1 F2 F3 F4 F5	Folículos jerárquicos
FSH	Hormona folículoestimulante
FSHR	Receptor de la hormona folículoestimulante
G	Guanina
GalNac	N-Acetil galactosamina
GDF9	Factor de crecimiento y diferenciación 9
GlcNac	N-acetil glucosamina
Gly	Glicina
GnIH	Hormona inhibidora de gonadotropinas
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GnRH-R	Receptor de GnRH
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GRK <sub>s</sub>	Quinasas de receptores acoplados a proteína G
HCG	Gonadotropina coriónica humana
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietyl)-1-piperacil]-etanosulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IC	Inseminación intracloual
Ile	Isoleucina
IMAC	Cromatografía de afinidad de iones inmovilizados
IO	Inseminación intraoviductal

IUCN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
KDa	Kilodalton
KeV	Kiloelectronvoltio
LB	Luria broth
LED	Diodo emisor de luz
Leu	Leucina
LH	Hormona luteinizante
LHR	Receptor de la hormona luteinizante
LWF	Folículo blanco grande
Lys	Lisina
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
mbar	Milibar
MHz	Megahercio
MS	Espectrómetro de masas
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
OCL	Ocludina
P450 <sub>scc</sub>	Colesterol desmolasa
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGCs	Células germinales primordiales
pGlu	Ácido piroglutámico
pH	Potencial de hidrogeniones
Phe	Fenilalanina
pI	Punto isoeléctrico
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLCz	Fosfolipasa C Z
POA	Área preóptica del hipotálamo
Pro	Prolina
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico

Ser	Serina
Sf21	<i>Spodoptera frugiperda</i>
siARN	ARN de interferencia de pequeño tamaño
SO3-GalNac	N-acetil galactosamina sulfato
SST	Túbulos de almacenamiento de esperma
StAR	Proteína reguladora de esteroidogénesis aguda
SWF	Folículo blanco pequeño
SYF	Folículo amarillo pequeño
T	Timina
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TAE	Tris Acetato EDTA
TBS	Solución salina tamponada con Tris
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
TSH	Tirotropina
Tyr	Tirosina
UI	Unidades internacionales
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
VTG	Vitelogenina
WB	<i>Western blotting</i>
ZP1	Proteína zona pelúcida 1
ZPC	Proteína zona pelúcida C

# **INTRODUCCIÓN**



## 1.1. AVES AMENAZADAS DE EXTINCIÓN. IMPORTANCIA DE LA REPRODUCCIÓN EN CAUTIVIDAD

Según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, de las aproximadamente once mil especies de aves registradas en la actualidad, 1.469 (13%) se encuentran incluidas en las categorías de “vulnerable”, “en peligro de extinción” o “en peligro crítico de extinción” a nivel mundial (IUCN 2018. *The IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2018-1. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 05 July 2018).

Desde 1500, 182 especies de aves han sufrido la extinción. En el último cuarto del siglo XX se extinguieron 19 especies, y en los dieciocho años transcurridos del presente, cuatro especies más han sufrido el mismo proceso. En la actualidad, 5 especies se encuentran extintas en la naturaleza y sólo existen ejemplares de las mismas en cautividad (BirdLife International, 2017. *We have lost over 150 bird species since 1500*. <http://www.birdlife.org>).

Un amplio espectro de actividades humanas se relaciona directamente con el declive de las poblaciones de numerosas especies a nivel mundial. Entre ellas, la expansión de la agricultura, la explotación forestal, la presencia de especies invasoras en los hábitats, la polución ambiental, y el incremento en la actividad pesquera, juegan un papel importante. (BirdLife International, 2017. *A range of threats drives declines in bird populations*. <http://www.birdlife.org>).

De este modo, una de cada ocho especies de aves se encuentra amenazada de extinción. En los estudios realizados entre 1998 y 2008, se constató un deterioro en el estatus de las poblaciones de aves a nivel mundial, que persiste hasta la actualidad (BirdLife International, 2008. *The*

*status of the world's birds has deteriorated over the last 20 years.* <http://www.birdlife.org>).

Entre las estrategias para su conservación, la reproducción de aves *ex situ* con el objeto de la reintroducción en el medio natural de los individuos nacidos en cautividad es aceptada en la actualidad como una herramienta fundamental (Holt *et al* 2014).

Sin embargo, uno de los motivos del fracaso de programas de reproducción *ex situ* en aves es la ausencia de ciclos reproductivos espontáneos en los individuos mantenidos en cautividad. Esta circunstancia impide la producción de gametos maduros que, tras su fecundación, pudieran dar lugar a progenie. Entre las causas sugeridas para explicar esta circunstancia destacan la ausencia de estímulos ambientales necesarios para el desarrollo de ciclos hormonales reproductivos y el estrés, ambos asociados a las condiciones de vida en cautividad (Holt *et al.*, 2014).

Entre las técnicas de reproducción asistida en aves, la inseminación artificial y la criopreservación de esperma son los dos métodos más comúnmente empleados. Estas técnicas se utilizan en programas de reproducción de especies salvajes en cautividad cuando determinados factores comportamentales (ausencia de cópulas) o factores seminales (baja calidad del esperma) resultan en una baja proporción de fertilidad en los huevos puestos (Blanco *et al.*, 2000; Blanco *et al.*, 2002).

Por otro lado, los ejemplares de una especie disponibles en los programas de reproducción en cautividad son escasos con frecuencia. De este modo, cuando el proceso reproductivo culmina con éxito, los ejemplares reintroducidos en el medio natural mantienen un alto nivel de endogamia con la consiguiente pérdida de variabilidad genética. Esta pérdida de variabilidad genética podría afectar la viabilidad de la población a largo plazo (Ewing *et al.*, 2008).

El desarrollo de tecnologías para la inducción hormonal de ciclos reproductivos, en combinación con las tecnologías de criopreservación seminal e inseminación artificial en aves, podría incrementar los rendimientos reproductivos en poblaciones cautivas de aves amenazadas y maximizar la variabilidad genética de la progenie. Sin embargo, estas técnicas, aunque son utilizadas en inducción de ciclos reproductivos en mamíferos con finalidad conservacionista (da Paz *et al.*, 2006; Howard *et al.*, 1997; Pope, 2014), no se aplican en aves en la actualidad.

## 1.2. FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA EN AVES

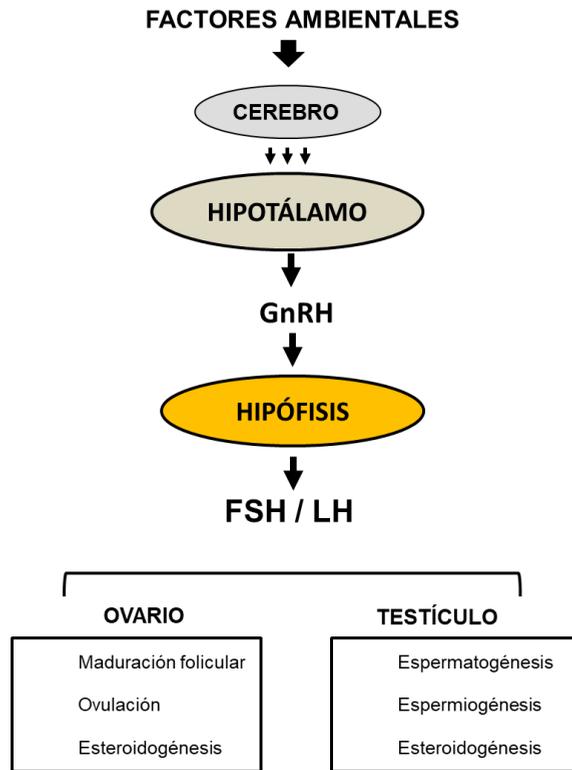
### 1.2.1. Eje hipotálamo hipofisario

En la naturaleza, el éxito reproductivo de las aves está directamente vinculado a que las diferentes fases de los ciclos reproductivos se den en condiciones ambientales favorables. Estas condiciones ambientales, o su previsión, son percibidas como señales por el ave a través de diferentes órganos sensoriales. Después de su integración cerebral, y en relación con el estado fisiológico general del individuo, los eventos neuronales son traducidos a señales químicas que provocarán los cambios fisiológicos, morfológicos y comportamentales apropiados para cada fase del ciclo reproductivo (Bentley *et al.*, 2007).

#### 1.2.1.1. Hormonas liberadoras de gonadotropinas en aves (GnRHs)

Entre las señales químicas fundamentales en el inicio de los ciclos reproductivos en aves, los factores hipotalámicos GnRHs (hormonas liberadoras de gonadotropinas) y GnIH (hormona inhibidora de gonadotropinas), desempeñan una importante función reguladora de la ciclicidad propia de estas especies (Tsutsui *et al.*, 2013).

En condiciones ambientales favorables, y en condiciones individuales de madurez puberal, se producirá la síntesis y liberación hipotalámica de GnRH, que, a su vez, induce la liberación de las hormonas foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH), también denominadas gonadotropinas hipofisarias, responsables de la maduración de los gametos y la secreción de hormonas sexuales (Ubuka *et al.*, 2013).



**Ilustración 1. Esquema representativo del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal en aves.**

En aves (*Gallus domesticus*) han sido aislados e identificados dos deca péptidos hipotalámicos con actividad GnRH (King y Millar, 1982a, 1982b; Miyamoto *et al.*, 1984) cuya nomenclatura y secuencia aminoacídica figuran a continuación:

- cGnRH-I : pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Gln-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>
- cGnRH-II: pGlu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>

Ambas moléculas han demostrado su capacidad para inducir la liberación de FSH y LH hipofisarias. Sin embargo, ambas exhiben una mayor actividad en la liberación de LH que de FSH tanto *in vitro* como *in vivo* (Hattori *et al.*, 1986).

En mamíferos, está bien documentada la liberación pulsátil de GnRH y la síntesis y secreción de FSH y LH en función de la amplitud y frecuencia de los pulsos de secreción de GnRH (Bedecarrats y Kaiser, 2003; Thompson y Kaiser, 2014). Sin embargo, la administración continua de GnRH induce la desensibilización de las células gonadotropas y la inhibición de la secreción de gonadotropinas (Sundaram *et al.* 1982; Vilchez-Martinez *et al.* 1979).

La administración prolongada de cGnRH induce un descenso en la liberación de FSH y LH en hipófisis de codorniz (*Coturnix coturnix*) *in vitro* (Hattori *et al.*, 1985). Por otro lado, las secciones de hipotálamo mediobasal (incluida área preóptica) de codorniz, incubadas *in vitro* en sistemas de perfusión, liberan cGnRH-I de forma episódica (Li *et al.*, 1994). Además, las células gonadotropas hipofisarias de gallina ponedora responden diferencialmente (secreción de gonadotropinas) en función de los pulsos de cGnRH-I administrados (Sonez *et al.*, 2010). Estas experiencias sugieren un mecanismo de liberación pulsátil para cGnRH-I en el desarrollo de su función biológica de inducción de síntesis y secreción de gonadotropinas en aves.

La inmunización activa frente a cGnRH-I induce la regresión del aparato reproductor en gallinas ponedoras, mientras que este fenómeno no ocurre cuando la inmunización se lleva a cabo frente a cGnRH-II (Sharp *et al.*, 1990). Por otro lado, la infusión de cGnRH-II en el tercer ventrículo del sistema nervioso central en hembras de gorrión de corona blanca (*Zonotrichia leucophrys gambelii*) induce el comportamiento de solicitud de cópula (Maney *et al.*, 1997). Estos experimentos sugieren la posibilidad de que cGnRH-I fuera el decapeptido hipotalámico responsable de la inducción de la secreción hipofisaria de gonadotropinas en aves, mientras que la actividad de cGnRH-II induciría determinados aspectos comportamentales en el ciclo reproductivo.

En estorninos pintos (*Sturnus vulgaris*), la presencia de GnRH-I en área preóptica del hipotálamo (POA), y la concentración de LH plasmática, sufren un incremento tras la exposición durante 10 días a fotoperiodo largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, 16L : 8O) tras 30 días de exposición a fotoperiodo corto (8L : 16O) (Dawson y Goldsmith, 1997). Además, en POA en esta especie, la expresión de GnRH-I (ARNm) disminuye asociada a fotorrefratariedad y a involución testicular (Stevenson *et al.*, 2009).

La expresión de cGnRH-I (ARNm) en el área preóptica hipotalámica sufre un incremento tras castración en gallos jóvenes. Sin embargo, este efecto puede ser prevenido mediante tratamiento con estradiol. A nivel adenohipofisario, el incremento en la expresión del receptor de GnRH tras castración también puede ser revertido mediante administración de estradiol (Sun *et al.*, 2001). Por otro lado, la secreción de LH inducida por GnRH en cultivos primarios de células adenohipofisarias de pollo disminuye en un 53-61% cuando las células se incuban en presencia de estradiol, testosterona y progesterona (King *et al.*, 1989).

Los receptores para la GnRH (GnRH-R) pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteína G (GPCR). En el caso de las aves, han sido caracterizados dos tipos de receptores para GnRH:

- GnRH-R-I (Sun *et al.*, 2001).
- GnRH-R-III (Shimizu y Bedecarrats, 2006).

En el caso de GnRH-R-I, su expresión se encuentra distribuida en las áreas preóptica (POA) y basal del hipotálamo, adenohipófisis y testículo (Sun *et al.*, 2001), mientras que GnRH-R-III se expresa en tejido adenohipofisario exclusivamente (McFarlane *et al.*, 2011).

### 1.2.1.2. Hormona inhibidora de gonadotropinas en aves (GnIH)

En 2000, se publicó la identificación y caracterización en cerebro de codorniz de un nuevo neuropéptido de la familia RF-amida (péptidos con motivo Arg-Phe-NH<sub>2</sub> en su extremo amino terminal) con actividad inhibitoria de la liberación de gonadotropinas: GnIH (Hormona inhibidora de gonadotropinas), con la siguiente secuencia aminoacídica (Tsutsui *et al.*, 2000):

GnIH: Ser-Ile-Lys-Pro-Ser-Ala-Tyr-Leu-Pro-Leu-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>

GnIH se expresa a nivel del núcleo paraventricular hipotalámico y ejerce su actividad biológica mediante la activación del receptor GPR147, perteneciente a la familia de receptores acoplados a proteína G, y con expresión a nivel hipotalámico, adenohipofisario y gonadal. GnIH inhibe la síntesis de las subunidades  $\beta$ -FSH y  $\beta$ -LH en las células gonadotropas adenohipofisarias en codorniz (Tsutsui *et al.*, 2000; Ubuka *et al.*, 2006) y pollo (Maddineni *et al.*, 2008). Además, GnIH inhibe la liberación de FSH y LH tras estímulo adenohipofisario con GnRH en diferentes especies de aves, y la liberación de testosterona a partir de cultivo testicular de gorrión común (*Passer domesticus*) bajo estímulo gonadotropo (FSH/LH) (Tsutsui *et al.*, 2012). Diferentes trabajos, sugieren la posibilidad de que GnIH pudiera inhibir, además, la secreción de GnRH (Ubuka *et al.*, 2014).

La administración combinada de estradiol o estradiol y progesterona, disminuye la expresión del ARNm de GnIH-R en adenohipófisis de pollo. Además, la expresión de GnIH-R (ARNm) es mayor en adenohipófisis de pollos sexualmente inmaduros respecto a pollos maduros. La disminución en la expresión de este receptor en presencia de hormonas esteroideas sexuales podría ser un mecanismo fisiológico para favorecer la secreción de

gonadotropinas en el momento de la maduración sexual (Maddineni *et al.*, 2008).

### **1.2.1.3. Fotoperiodo y estacionalidad reproductiva en aves. Estrés y factores sociales**

En latitudes templadas, la mayoría de las aves experimenta cambios en su actividad reproductiva directamente relacionados con las estaciones. Con respecto a las aves que habitan estas latitudes, la mínima disponibilidad de alimento coincide con la máxima demanda energética durante el invierno. Por ello, las aves restringirán adaptativamente determinadas actividades con alto coste energético (reproducción, muda, etc.) a determinados periodos del año en que las condiciones ambientales sean óptimas para el desarrollo de estas (Kriegsfeld *et al.*, 2015). Dado que el fotoperiodo es uno de los factores más fiables para anticipar el momento óptimo de reproducción para cada especie, las aves utilizan esta señal para desarrollar los mecanismos fisiológicos de la reproducción estacional.

#### 1.2.1.3.1. Fisiología de la melatonina en el ciclo reproductivo en aves

---

La secreción de melatonina es proporcional al fotoperiodo. Dado que la secreción de esta hormona es nocturna, dicha secreción será inversamente proporcional a la duración del día. En codorniz, la administración de melatonina induce una ralentización del desarrollo testicular y la actividad reproductiva inducida por fotoperiodo largo (Guyomarc'h *et al.*, 2001). Además, la administración de esta hormona disminuye los niveles plasmáticos de LH en gallos castrados (Rozenboim *et al.*, 2002).

La administración subcutánea de melatonina induce la expresión de GnIH y GnIH (ARNm) en diencéfalo en codorniz (Ubuka *et al.*, 2005) y en

explantos diencefálicos de codorniz *in vitro* (Chowdhury *et al.*, 2010). Además, la expresión de GnIH es dependiente de fotoperiodo, con incrementos nocturnos positivamente relacionados con disminución de los niveles de LH plasmática (Chowdhury *et al.*, 2010). La exéresis de los ojos y la glándula pineal (los dos principales productores de melatonina en codorniz) disminuye la expresión de GnIH (ARNm y péptido) en hipotálamo. Este hecho se debe, al menos en parte, a la disminución de la actividad directa de la melatonina sobre las células productoras de GnIH del núcleo paraventricular del hipotálamo (Ubuka *et al.*, 2005).

Estos resultados sugieren que el incremento en la expresión de GnIH en fotoperiodo corto (mediada por melatonina) pudiera explicar en parte el bloqueo reproductivo de las aves en zonas templadas durante el otoño e invierno.

#### 1.2.1.3.2. Estrés y factores sociales en fisiología del ciclo reproductivo en aves

---

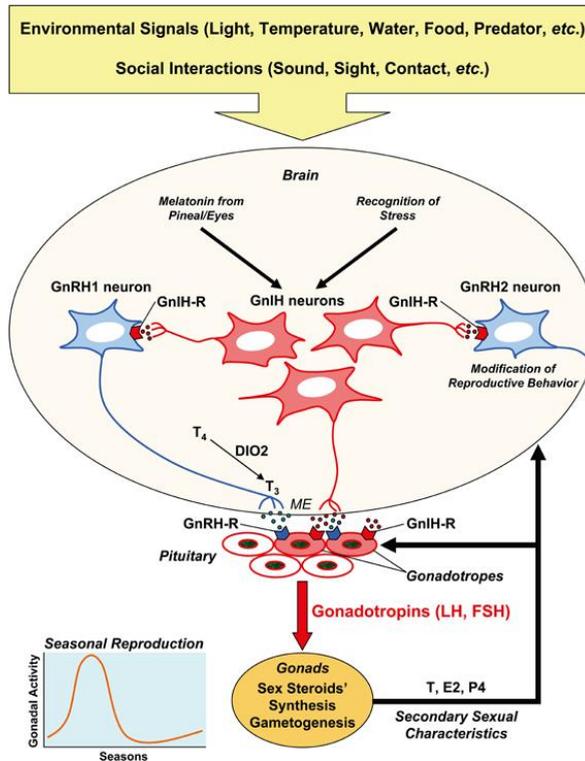
El estrés es un conocido inhibidor de la actividad reproductiva. El estrés provocado por la captura y restricción del movimiento en gorriones comunes (*Passer domesticus*) induce un incremento de la concentración de glucocorticoides plasmáticos (Lynn y Porter, 2008). En individuos de esta especie sometidos a este tipo de estrés se evidencia un incremento significativo de neuronas GnIH inmunorreactivas que podría estar relacionado con el incremento de glucocorticoides plasmáticos (Calisi *et al.*, 2008).

También los factores sociales son relevantes en la función reproductiva aviar. En aviarios que permiten el proceso reproductivo completo en estornino pinto (*Sturnus vulgaris*), la reducción de cajas nido resulta en disminución de neuronas GnIH inmunorreactivas en aves que han

conseguido un nido (“winners”) con respecto a aves que no lo han conseguido (“losers”) al comienzo de la estación de cría. Sin embargo, durante el periodo de cría, el número de neuronas GnIH inmunorreactivas disminuyó en “winners” respecto a “losers”. Estos resultados indican que la expresión de GnIH pudiera ejercer una función como modulador del comportamiento reproductivo en respuesta al entorno social (Calisi *et al.*, 2011).

#### 1.2.1.3.3. Hormonas tiroideas en la regulación del ciclo reproductivo

Las hormonas tiroideas han cobrado relevancia en el estudio de la señalización fisiológica del fotoperiodo durante los últimos años. En codorniz, la expresión de *Dio2* (deiodinasa tipo 2), enzima convertora de tiroxina (T4) en triiodotironina (T3), que es la forma con mayor bioactividad de la hormona, es inducida por fotoperiodo largo e inhibida por fotoperiodo corto en los tanicitos que revisten el tercer ventrículo a nivel del hipotálamo mediobasal. La T3 así generada, induciría la secreción de GnRH (Ikegami y Yoshimura, 2012; T. Yoshimura *et al.*, 2003). Aunque no se ha demostrado en aves, la melatonina inhibe la expresión de *Dio2* en hámster (Revel, Saboureau *et al.*, 2006).



**Ilustración 2. Representación esquemática de fisiología neuroendocrina de la reproducción en aves**

Las aves sujetas a reproducción estacional detectan señales del entorno como fotoperíodo, temperatura, disponibilidad de agua y alimento, presión de depredadores, entorno social, etc., para programar su reproducción. Las neuronas hipotalámicas integran las señales externas e internas y regulan la reproducción mediante la liberación de neurohormonas en la eminencia media para regular a su vez la síntesis y liberación de gonadotropinas adenohipofisarias, que inducirán la gametogénesis y la secreción de hormonas esteroideas. El péptido hipotalámico GnRH-I, a través de su receptor (GnRH-R) en las células gonadotropas, activa la reproducción mediante la inducción de síntesis y secreción de gonadotropinas. Otro péptido hipotalámico, GnIH, inhibe la síntesis de gonadotropinas actuando directamente sobre las células gonadotropas o bien sobre la actividad de las neuronas productoras de GnRH-I a través de su receptor GnIH-R, expresado tanto en las células gonadotropas como en las neuronas productoras de GnRH-I. Las neuronas productoras de GnRH-II podrían inducir comportamiento reproductivo, mientras GnIH podría

inhibirlo mediante la inhibición de las neuronas productoras de GnRH-II. Las neuronas GnRH y GnIH hipotalámicas y sus receptores en la adenohipófisis también están reguladas por señales internas como testosterona, estradiol y progesterona. Se hipotetiza que la T3 producida localmente a partir de T4 mediante la actividad de *Dio2* en el hipotálamo mediobasal induce la liberación de GnRH-I. Dado que la melatonina, una hormona de liberación nocturna, estimula la síntesis y secreción de GnIH en aves, GnIH podría regular el ritmo diario de secreción de gonadotropinas. GnIH podría, también, suprimir la secreción de gonadotropinas cuando las condiciones ambientales o sociales fueran desfavorables. Reproducido de (Ubuka *et al.*, 2013).

### 1.2.2. Gonadotropinas en aves

Las gonadotropinas aviares, FSH y LH, como en otros vertebrados, son hormonas de naturaleza glicoproteica sintetizadas por células gonadotropas adenohipofisarias (Proudman *et al.*, 1999).

Tanto la FSH como la LH están formadas por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) unidas de modo no covalente y sintetizadas a partir de diferentes genes (Shen & Yu, 2002). La subunidad  $\alpha$  es común a ambas hormonas y a la tirotropina (TSH), mientras la subunidad  $\beta$  es específica para cada hormona ( $\beta$ -FSH y  $\beta$ -LH) (Krishnan *et al.*, 1992, 1994).

Los procesos de purificación llevados a cabo por diferentes grupos, sugieren pesos moleculares de 38.000 Da y punto isoeléctrico (pI) de 4,65 para la FSH de pollo, y de 37.000 Da y pI = 9,08-9,55 en LH de la misma especie (Krishnan *et al.*, 1992, 1994).

Las secuencias aminoacídicas para cada subunidad han sido deducidas en diferentes especies de aves a partir de su ADN complementario (ADNc) o mediante análisis genómico. La secuencia de la subunidad  $\alpha$  ha sido deducida en codorniz (Ando & Ishii, 1994), gallina (Carre *et al.*, 2006; Foster *et al.*, 1992), pavo (*Meleagris gallopavo*) (Foster y Foster, 1991), ánade real (*Anas platyrhynchos*), ánade criollo (*Cairina moschata*) (Hsieh, Chatterjee, Chien, & Yu, 2001), y paloma doméstica (*Columba livia*) (GenBank:

PKK33488.1) entre otras especies. Las secuencias de la subunidad  $\beta$ -FSH de codorniz (Kikuchi *et al.*, 1998), gallina (Shen & Yu, 2002), pavo (NCBI Reference Sequence: XM\_003206084.2) y paloma (GenBank: PKK29307.1) también son conocidas, mientras las secuencias de la subunidad  $\beta$ -LH están descritas en codorniz (Ando e Ishii, 1994), pollo (GenBank: ADY03193.1) y pavo (You *et al.*, 1995).

La secuencia aminoacídica de la subunidad  $\alpha$  en codorniz consta de un total de 120 aminoácidos y está compuesta por un péptido señal de 24 residuos (1-24) y una proteína madura de 96. En la posición 80-82 de la proteína existe un potencial sitio de N-glicosilación (Asparagina-isoleucina-treonina) (Ando e Ishii, 1994). En codorniz, pollo, pavo y paloma, la proteína madura de esta subunidad es idéntica en todas ellas según alineamiento llevado a cabo con el programa UniprotKB Align (<https://www.uniprot.org/align/>).

La subunidad  $\beta$ -FSH de codorniz está compuesta por un total de 131 aminoácidos. Los residuos aminoacídicos 1-20 corresponden al péptido señal, mientras los 111 residuos restantes constituyen la proteína madura. En esta última, existen tres potenciales sitios de glicosilación. Las identidades de los aminoácidos de la subunidad  $\beta$ -FSH de codorniz con respecto a las de pavo, pollo y paloma son de 98,47; 98,47 y 93,89% respectivamente según alineamiento realizado con el programa UniprotKB Align (<https://www.uniprot.org/align/>). En codorniz, pavo y pollo, los tres potenciales sitios de N-glicosilación están conservados, mientras en paloma falta el más próximo al carboxilo terminal (N127K) según predicción realizada mediante NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services>). El péptido señal corresponde a los aminoácidos 1-20 en todas estas especies según predicción realizada mediante el programa SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

```

CODORNIZ MKTLNLCYVLLFCWKAICCYSCELTNITIAVEREECEMCITVNATWCSGYCFTRDPVYKYP 60
PAVO      MKTLNLCYVLLFCWKAICCYSCELTNITIAVEREECELCTVNATWCSGYCFTRDPVYKYP 60
POLLO     MKTLNLCYVLLFCWKAICCYSCELTNITIAVEREECELCTVNATWCSGYCFTRDPVYKYP 60
PALOMA    MKTLNLCYVLLFCWKAICCNQCQLTNITIAVEREECEFCIMVNATWCSGYCFTRDPVYKYP 60
          ***** **;*****:*** *****

CODORNIZ PVSSVQQICTFKEVVYETVKIPGCGDHPESFYSYPVATGCHCETCDTDSTDCTVRGLGPS 120
PAVO      PVSSVQQICTFKEVVYETVKIPGCGDHPESFYSYPVATACHCETCDTDSTDCTVRGLGPS 120
POLLO     PVSSVQQICTFKEVVYETVKIPGCGDHPESFYSYPVATECHCETCDTDSTDCTVRGLGPS 120
PALOMA    PVSSVQQICTFKEVVYETVKIPGCGDHPESFYSYPVATECHCETCDTDSTDCTVRGLGPS 120
          ***** *****

CODORNIZ YCSFSHNGSNQ 131
PAVO      YCSFSHNGSNQ 131
POLLO     YCSFSHNGSNQ 131
PALOMA    YCSFQKGSNQ 131
          *****:****

```

**Figura 1. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las subunidades beta de FSH de codorniz, pavo, pollo y paloma.**

En las posiciones 25 (NIT), 42 (NAT) y 127 (NGS) de las secuencias de codorniz, pavo y pollo se encuentran los potenciales sitios de N-glicosilación. En paloma, sólo en las posiciones 25 y 42.

La expresión de ARNm de la subunidad  $\beta$ -FSH es inducida en tejido hipofisario de pollo por GnRH (Shen y Yu, 2002), mientras que en dispersiones celulares hipofisarias de esta especie, GnRH induce la expresión de ARNm de la subunidad  $\beta$ -LH mientras la prolactina la inhibe (You *et al.*, 1995).

El mismo efecto inductor de la GnRH es evidenciado en la expresión de ARNm de la subunidad  $\alpha$  en ánade real y ánade criollo *in vitro* en incubación de fragmentos adenohipofisarios. La hormona liberadora de tirotropina (TRH) también induce su síntesis en estas condiciones, mientras que la testosterona y la triiodotironina (T3) inhiben su expresión (Hsieh *et al.*, 2001).

En mamíferos, está demostrada la acción de la inhibina secretada por tejidos gonadales en la inhibición de la síntesis y secreción de FSH adenohipofisaria (Taya *et al.*, 1996). Sin embargo, en aves aún es confuso el

papel de la inhibina. A pesar de ello, la secreción de inhibina a partir de los folículos preovulatorios (fundamentalmente los folículos más maduros), y la correlación negativa entre niveles plasmáticos de inhibina y de FSH sugieren la posibilidad de la regulación en la síntesis y secreción adenohipofisaria de FSH por inhibina A en aves (Lovell *et al.*, 2000).

Los receptores de FSH (FSHR) y LH (LHR) han sido caracterizados en aves. Ambos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G. Este tipo de receptores posee un dominio amino terminal extracelular y un dominio carboxilo terminal intracelular además de siete dominios transmembrana. La activación de este receptor y el complejo proteína G induce la actividad adenilato ciclasa, que se traduce en el aumento de la concentración de AMPc intracelular y la activación de proteína quinasa A. La activación de esta enzima induce respuestas celulares que activan la expresión de enzimas esteroideogénicos y otros elementos de diferenciación celular en las células foliculares (como la expresión del receptor LHR) (Mizutani *et al.*, 1998; You *et al.*, 1996).

Las secuencia aminoacídica del receptor FSHR en pollo tiene una homología del 71,9 y el 72,4% comparadas con las de rata y bovinos respectivamente (You *et al.*, 1996), y del 93% comparada con la de pato criollo (*Cairina moschata*) (Xu *et al.*, 2017), del 94,6% con respecto a la secuencia del FSHR de pavo (NCBI Reference Sequence: XM\_021390912.1), y del 85,3% respecto a la de paloma (NCBI Reference Sequence: XM\_005498409.3) al ser alineadas mediante el programa UniprotKB (<https://www.uniprot.org/align/>).

El receptor FSHR se expresa en las células del estroma ovárico y en las células foliculares de la granulosa y la teca. La expresión en células de la granulosa disminuye hasta mínimos en folículos maduros preovulatorios (F1). El receptor LHR se expresa en células de la teca del folículo a lo largo de todo su desarrollo, mientras que en las células de la granulosa su

expresión comienza en folículos de 9-11 mm y es máxima en folículos preovulatorios maduros (Zhang *et al.*, 1997).

### 1.2.3. Fisiología ovárica en aves

#### 1.2.3.1. Anatomía del ovario

En la mayoría de las aves, a diferencia del resto de vertebrados, el desarrollo embrionario del ovario y el oviducto se produce de modo asimétrico, llegando al final del desarrollo únicamente las estructuras localizadas en el lado izquierdo. Esta característica es habitualmente atribuida a un proceso evolutivo de adaptación al vuelo (Guioli *et al.*, 2014; Jacob y Bakst, 2007a, 2007b; Zheng *et al.*, 2013).

Sin embargo, existen excepciones a esta asimetría en algunas especies como el kiwi (*Apteryx australis*) y en órdenes como ciconiiformes y falconiformes en los que ambos ovarios pueden desarrollarse (Kinsky, 1971).

El ovario de las aves se encuentra en el interior de la cavidad abdominal (celómica) e insertado en el retroperitoneo mediante el ligamento mesoovárico (hilus) a la altura del polo craneal del riñón. Está recubierto por un mesotelio superficial en monocapa adaptado al rápido crecimiento y regresión que caracteriza esta estructura a la que rodea. A través del hilus, penetran en el ovario los vasos sanguíneos arteriales y venosos y las fibras nerviosas (Apperson *et al.*, 2017; Chalana y Guraya, 1979).

En aves, el peso ovárico varía radicalmente en función del estado reproductivo. En las aves de reproducción estacional, los folículos ováricos se desarrollan masivamente en la etapa reproductiva para sufrir posteriormente atresia y reabsorción al terminar la puesta. El peso ovárico en ciclo de puesta puede ser cien veces superior al peso del ovario en estado

de reposo reproductivo. La mayoría de este incremento de peso se debe a la acumulación de vitelo intraovocitario. Este fenómeno también es atribuido a la adaptación al vuelo, la reducción del coste metabólico del vuelo, y la reducción del riesgo de predación (Johnson y Woods, 2007).

El ovocito maduro de las aves se caracteriza por ser de gran tamaño. En avestruz, el ovocito alcanza los 10 cm de diámetro (Bronneberg y Taverne, 2003). Sin embargo, en gallina, esta estructura no suele exceder los 4 cm. La mayoría del volumen del ovocito en aves está constituida por vitelo, por lo que es clasificado morfológicamente como óvulo megalecito y telolecito. En la superficie del óvulo (gallina), puede observarse a simple vista la presencia de una estructura blanquecina de 3 a 5 mm de diámetro denominada disco germinal, que contiene el núcleo y el 99% de los orgánulos celulares pese a ocupar menos del 1% del volumen total del ovocito (Yao y Bahr, 2001).

El ovocito se encuentra rodeado por la membrana perivitelina, equivalente a la membrana pelúcida en mamíferos. En aves se han descrito dos proteínas homólogas a las descritas en mamíferos, ZP1 (sintetizada en el hígado bajo el estímulo de estrógenos) y ZPC, sintetizada por las células de la granulosa (Bausek *et al.*, 2000; Sasanami *et al.*, 2004).

En el folículo maduro, una capa simple de células de la granulosa rodea el ovocito y la membrana perivitelina. Exterior a la granulosa, se encuentran las capas de la teca interna y la teca externa. Las capas de la granulosa y de la teca están separadas por una membrana basal (A. L. Johnson y Woods, 2007).

Los folículos primordiales y los folículos primarios en etapas iniciales del desarrollo están rodeados por tejido cortical. Al contrario que en mamíferos, los folículos ováricos en estadio evolutivo superior al de folículos primordiales o con diámetro  $\geq 1$  mm, protruyen desde el estroma para acabar unidos al ovario mediante un pedículo de modo estructuralmente semejante a los granos de un racimo de uvas (A. L. Johnson y Woods, 2007).

El ovario en aves está compuesto por dos tejidos diferenciados, el córtex y la médula. Desde el punto de vista histológico, el estroma ovárico está constituido por tejido medular y cortical intercalado. Las células del córtex y las medulares pueden distinguirse fácilmente a microscopía óptica. Mientras las células del córtex teñidas con hematoxilina-eosina presentan un aspecto basofílico, las medulares presentan un aspecto eosinofílico. La médula ovárica está constituida por células de músculo liso, tejido colágeno con abundantes fibroblastos, fibras nerviosas y vasos sanguíneos. Los vasos sanguíneos en la médula son de mayor calibre que los del córtex (Apperson *et al.*, 2017).

La vascularización ovárica en aves procede de la arteria renal superior, mientras que el retorno venoso desemboca en la vena cava caudal. Los folículos primordiales están vascularizados por los capilares del estroma, mientras que en etapas posteriores de desarrollo, cuando abandonan el estroma ovárico, reciben vascularización a través del pedículo por dos a cuatro arteriolas procedentes de la arteria ovárica y que se extienden, junto a su red capilar, por la teca. La capa de células de la granulosa no recibe vascularización directa. En la superficie de los folículos en maduración, existe una región avascular y de forma lineal en la que las células foliculares entran en contacto con el mesotelio superficial; esta región se denomina estigma y tiene la función de ser el punto de ruptura durante la liberación del óvulo en el proceso de ovulación (Johnson y Woods, 2007).

Como en el resto de los vertebrados, en aves, durante el desarrollo embrionario precoz, las células germinales primordiales (PGCs) migran a las crestas germinales donde se transforman en oogonias mitóticamente activas. Posteriormente, las oogonias entran en el proceso meiótico evolucionando hasta la fase diplotene de la primera profase meiótica. La célula resultante (ovocito primario), quedará en este estadio del ciclo celular hasta la pubertad (Johnson y Woods, 2007).

Poco después de la eclosión y nacimiento del embrión, en gallina, los ovocitos primarios se rodean de células somáticas (granulosa). Este conjunto es denominado folículo primordial y permanece inmerso en el estroma cortical del ovario. Los ovocitos que no se rodean de células de la granulosa, sufrirán muerte celular vía apoptosis. En etapas posteriores del desarrollo y crecimiento folicular, otra capa de células somáticas, la teca, rodeará a las células de la granulosa. Ambas capas estarán separadas por una membrana (o lámina) basal. La señalización paracrina entre ovocito, células de la granulosa y células de la teca es esencial para el ulterior desarrollo del folículo (Diaz *et al.*, 2014).

Los folículos primarios se desarrollarán eventualmente hasta folículos jerárquicos o preovulatorios. Una vez maduros, podrán sufrir el proceso de ovulación mediante rotura de la pared folicular y liberación del óvulo en el oviducto, donde tendrá lugar la fecundación y la formación del huevo mediante la adición del albumen, las membranas de la cáscara y la cáscara. En este proceso de crecimiento y maduración folicular, la nomenclatura en los folículos de gallina más frecuentemente utilizada en función de su diámetro y aspecto macroscópico, y por orden evolutivo, es la siguiente ( Johnson y Woods, 2007; Johnson, 2012; Johnson *et al.*, 2015):

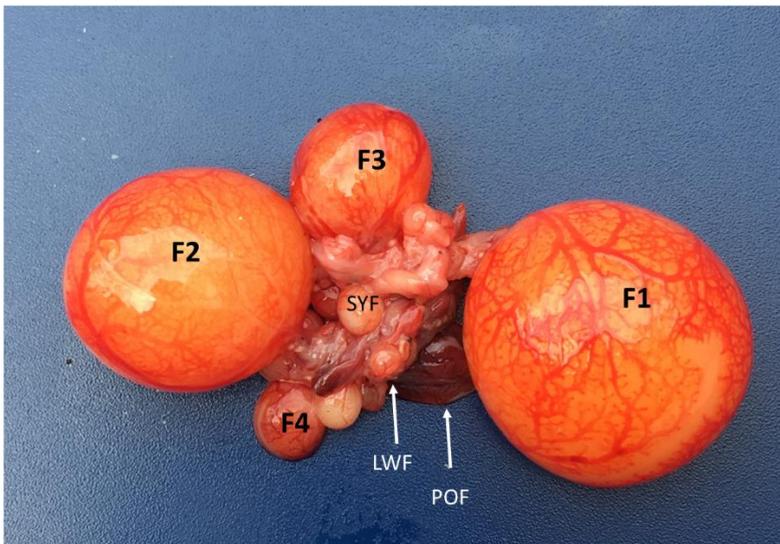
- Folículo primordial:  $\leq 80 \mu\text{m}$
- Folículo primario: 0,08-1 mm
- Folículos prejerárquicos: 1-8 mm.
- Folículos jerárquicos o preovulatorios: 8-40 mm

A su vez, los folículos prejerárquicos pueden dividirse en:

- Folículos blancos pequeños (SWF por sus siglas en inglés): 1-3 mm
- Folículos blancos grandes (LWF): 3-5 mm
- Folículos amarillos pequeños (SYF): 6-8 mm

Los folículos jerárquicos o preovulatorios se denominan, en función de su diámetro, y de menor a mayor: F6/F5, F4, F3, F2 y F1, siendo este último el más maduro y próximo a la ovulación.

Por último, tras la ovulación, las células foliculares colapsan formando el folículo postovulatorio (POF).



**Ilustración 3. Aspecto macroscópico del ovario de codorniz.**

F1, F2 y F3 hacen referencia a los folículos preovulatorios en su orden jerárquico.  
 SYF= Folículo amarillo pequeño, prejerárquico. LWF= Folículo blanco grande.  
 POF= Folículo postovulatorio.

### 1.2.3.2. Dinámica folicular

El estudio de la dinámica folicular en aves se ha llevado a cabo fundamentalmente en gallina y, en concreto, en diferentes razas de gallinas ponedoras. En estas, la puesta diaria de un huevo determina una dinámica folicular con características únicas entre los vertebrados, dado que la puesta diaria durante meses, y por tanto la ovulación diaria previa a la formación del huevo, implica la necesidad de una constante provisión de folículos

preovulatorios jerarquizados (Johnson *et al.*, 2015). En codornices de razas ponedoras, la puesta de 250-270 huevos al año implica una dinámica folicular semejante a la de gallina (Karami *et al.*, 2017).

Al inicio de la maduración sexual en gallina, el ovario contiene alrededor de 12.000 folículos. Sólo una pequeña fracción de estos (200-500) evolucionará hasta folículos preovulatorios maduros en su vida reproductiva. En aves salvajes este número será, lógicamente, mucho menor (Johnson y Woods, 2007).

La transición de los folículos primordiales a folículos primarios implica el incremento de diámetro en el ovocito y cambios morfológicos en las células de la granulosa que lo rodean. Estas células pasan de tener un aspecto plano y alargado a adquirir una morfología cuboidal. Además, la transición de estos folículos primarios a folículos primarios activos está asociada a la formación de la capa de células de la teca, derivadas de células mesenquimales (Johnson, 2014).

#### 1.2.3.2.1. Factores proteicos asociados al desarrollo folicular en aves

---

Los factores involucrados en el proceso de desarrollo temprano y en la transición de los folículos primarios en estado quiescente a folículos activados en fase de crecimiento lento han sido investigados escasamente en aves. Sin embargo, algunos de estos factores, homólogos a los de mamíferos, se expresan en estadios precoces del desarrollo folicular sugiriendo diversas actividades relacionadas con este proceso.

El sistema ligando de KIT y su receptor con actividad enzimática tirosina quinasa c-KIT han sido relacionados con el desarrollo folicular temprano y la activación de folículos primordiales en mamíferos (John *et al.*, 2009; Parrott & Skinner, 1997, 1999; Yoshida *et al.*, 1997). En gallina, la expresión de KIT-ARNm es máxima en folículos de diámetro  $\leq 1$  mm y en las células del

estroma, mientras c-KIT se expresa en folículos de diámetro  $\leq 1$  mm en células de la teca, pero no en granulosa. Estos resultados sugieren un papel de este sistema en aves semejante al observado en mamíferos (Kundu *et al.*, 2012).

La hormona antimülleriana (AMH) inhibe el crecimiento y activación de los folículos primordiales en ratón (Durlinger *et al.*, 2002) y disminuye la sensibilidad a FSH de los folículos preantrales en esta especie (Durlinger *et al.*, 2001). Sin embargo, en aves, y a pesar de que su papel en la inhibición del desarrollo del oviducto derecho es conocida (Teng, 1987) la función de AMH en el desarrollo folicular es desconocida. En gallina, la expresión de AMH está restringida a folículos en fase de crecimiento inicial y, de un modo paralelo a lo que ocurre en mamíferos, esta expresión disminuye en folículos próximos a la selección prejerárquica (Johnson, 2012).

El ovocito desarrolla un papel fundamental en la regulación y promoción del folículo que lo alberga mediante la síntesis y secreción de factores que actúan de forma paracrina sobre las células foliculares. En ratón, el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9), un factor ovocitario perteneciente a la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), es fundamental para el desarrollo de los folículos primordiales, para el reclutamiento de las células de la teca y la expresión de receptores FSHR (Dong *et al.*, 1996; Otsuka *et al.*, 2011). En gallina, GDF9 es expresado en folículos de 50-300  $\mu\text{m}$  e induce la proliferación de células de la granulosa *in vitro*, lo que sugiere una función homóloga a la observada en mamíferos (Johnson *et al.*, 2005).

La proteína morfogenética ósea 15 (BMP15) tiene un importante papel en la diferenciación de las células somáticas foliculares y en el desarrollo del folículo en mamíferos (Otsuka *et al.*, 2011; Shimasaki *et al.*, 2004). En gallina, este factor se expresa fundamentalmente en el ovocito de los folículos de 6-8 mm de diámetro, induce la expresión del receptor FSHR, e inhibe la

expresión de AMH y ocludina (OCL). Estos efectos están directamente relacionados con la selección de los folículos amarillos pequeños (SYF) para su incorporación a la jerarquía preovulatoria (Stephens y Johnson, 2016).

BMP4, es expresada en células de la granulosa y la teca de folículos prejerárquicos, aunque su expresión aumenta 2-4 veces en folículos de 9-12 mm. Las células de la granulosa de folículos prejerárquicos y de F5 incubadas en presencia de BMP4 mantienen la expresión de FSHR (ARNm) en niveles comparables a los fisiológicos, mientras que, en ausencia de esta proteína, la expresión de FSHR disminuye un 80% (Kim *et al.*, 2013).

BMP6, tiene su máxima expresión en células de la granulosa de folículos de 1-8 mm e induce la expresión de FSHR (ARNm) en folículos prejerárquicos (Ocon-Grove *et al.*, 2012).

Además, tanto el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ) como activina A inducen la expresión de FSHR en células de la granulosa en mamíferos (Knight y Glister, 2003). La incubación *in vitro* con activina A y TGF $\beta 1$  induce la expresión de FSHR en células de la granulosa de folículos prejerárquicos en gallina (Woods y Johnson, 2005).

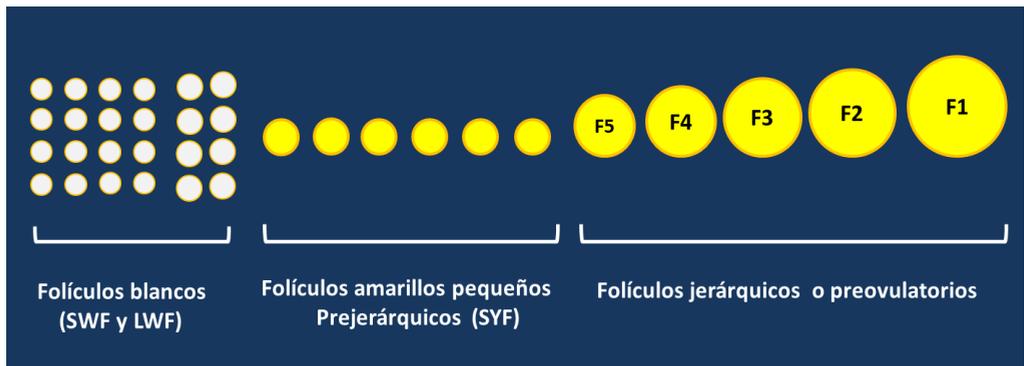
#### 1.2.3.2.2. Selección de folículos jerárquicos o preovulatorios en aves

---

En gallina, los folículos de 1-5 mm de diámetro, también denominados folículos blancos o folículos en fase de crecimiento lento, acumulan vitelo rico en proteínas durante semanas (fase de crecimiento lento). Posteriormente, el ovocito acumula lipoproteínas y xantofilas, que dan al vitelo su color amarillo característico. Estos folículos amarillos tienen un diámetro de 6-8 mm y son denominados folículos amarillos pequeños (SYF por sus siglas en inglés). Posteriormente, los SYF entran en la fase de crecimiento rápido en la que se convierten en folículos preovulatorios (jerárquicos). Esta fase se caracteriza por una masiva adquisición de vitelo y

convierte al folículo SYF en F1 en un plazo de seis días aproximadamente (Johnson y Woods, 2007).

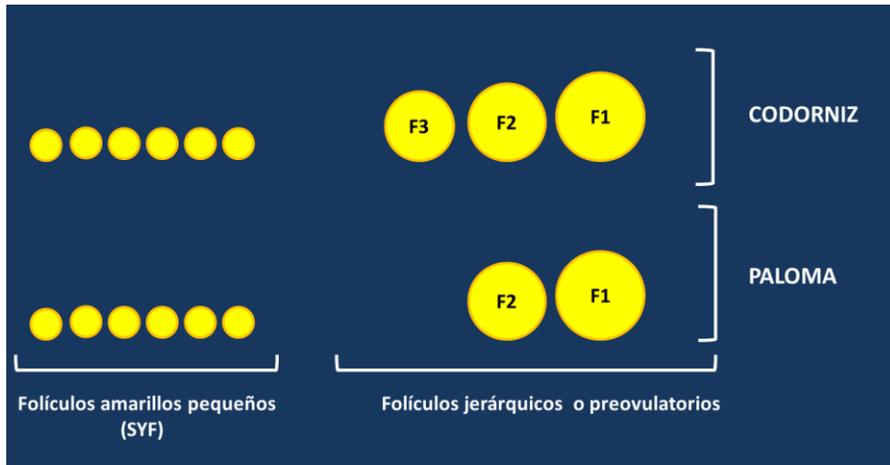
En el ovario de gallina en ciclo de puesta se observan cientos de folículos de entre 1-5 mm de diámetro (SWF y LWF), alrededor de 6 folículos de entre 6-8 mm (SYF) y 5-6 folículos jerárquicos o preovulatorios de diámetros comprendidos entre 9 y 35-40 mm (Ilustración 4).



**Ilustración 4. Imagen representativa de las poblaciones foliculares ováricas de gallina.**

En gallina ponedora, suelen encontrarse entre 6-8 folículos SYF y 5-6 folículos jerárquicos preovulatorios en fase de rápido crecimiento a lo largo del ciclo de puesta.

En codorniz, el número de folículos jerárquicos es menor que en gallina, con una jerarquía formada por tres o cuatro folículos (F4/F3, F2 y F1) (Ramasamy *et al.*, 2014). En palomas, una especie caracterizada por realizar puestas determinadas de dos huevos, la jerarquía folicular está formada por sólo dos folículos preovulatorios (F2 y F1), aunque el número de folículos prejerárquicos SYF es similar al observado en codorniz y gallina (Goerlich *et al.*, 2010; Matthews, 1939).



**Ilustración 5. Imagen representativa de las poblaciones foliculares ováricas de codorniz y paloma.**

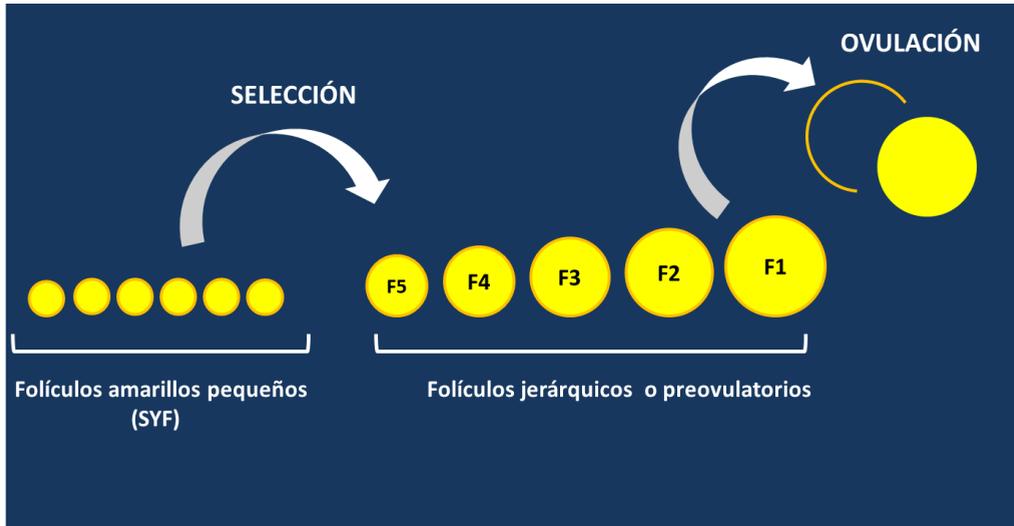
En codorniz en ciclo de puesta, suelen encontrarse entre 5-6 folículos SYF y 3-4 folículos jerárquicos preovulatorios en fase de rápido crecimiento. En paloma, sólo existen dos folículos jerárquicos (tres excepcionalmente). En esta especie, esta estructura de la población folicular sólo se encontrará en los días inmediatamente previos a la puesta, y esta se da sólo en determinadas condiciones ambientales y sociales.

En mamíferos, el reclutamiento y desarrollo folicular preovulatorio es debido a la acción de la FSH. El incremento de la concentración plasmática de la FSH induce el reclutamiento de numerosos folículos (preantrales y antrales, en función de la especie). Sin embargo, el desarrollo del folículo dominante persiste gracias a su elevada sensibilidad a esta hormona pese a la disminución parcial de los niveles plasmáticos de FSH secundaria al incremento de inhibina y estradiol. Como consecuencia de esta disminución de la concentración plasmática de FSH al final de la fase folicular del ciclo, los folículos subordinados (con menor sensibilidad a FSH) sufrirán el proceso de atresia. El folículo dominante experimentará un cambio en la población de receptores de sus células de la granulosa, con disminución de los receptores FSHR e incremento de LHR, y la oleada preovulatoria de LH

inducirá su ovulación. Este es el caso en especies monovulares, mientras que, en especies de ovulación múltiple, la dominancia se establece sobre múltiples folículos (Ginther, 2012; Mihm y Evans, 2008).

De este modo, en mamíferos, se producen ciclos ovulatorios separados en el tiempo por un intervalo característico de especie. Por el contrario, en gallina, las oleadas preovulatorias de LH y las ovulaciones se dan con una periodicidad diaria aproximadamente (24-27h) durante ciclos de puesta que pueden durar meses (Liu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2001; Katuhide *et al.*, 1967). Esta característica biológica determina la diferencia en la dinámica folicular en aves con respecto a mamíferos. En gallinas, cada día se produce un pico ovulatorio de LH que inducirá la ovulación del folículo más maduro (F1). Un día después, el folículo F2 se habrá convertido en F1 y volverá a repetirse el proceso ovulatorio, y así ocurrirá sucesivamente en ciclos de 6-8 días interrumpidos por un día de pausa entre ellos y durante meses (Johnson, 2014; Wells *et al.*, 1985). Por tanto, la ovulación del folículo dominante no se asocia a la atresia de los folículos subordinados como ocurre en mamíferos.

La ovulación diaria del folículo F1 implica la reposición de este folículo también de forma diaria para el mantenimiento de la jerarquía y el ritmo de ovulación y puesta de huevos. Cada día, un folículo del conjunto SYF es seleccionado e incorporado a la jerarquía de folículos preovulatorios y se convierte en F5/F6. De este modo, la jerarquía incorpora diariamente el folículo perdido en la ovulación (F1). Este fenómeno diario, sin embargo, no se da cuando no se produce la ovulación, por ejemplo, en la pausa de un día sin ovulación y puesta típico en gallinas. El mecanismo que coordina la ovulación con la selección de un folículo SYF y su incorporación a la jerarquía es desconocido (Johnson, 2015).



#### Ilustración 6. Selección folicular en gallina.

Cada día, un folículo de la población SYF es seleccionado para su incorporación a la jerarquía folicular preovulatoria en la gallina ponedora. El folículo F1 ovula tras el incremento diario de la concentración de LH en plasma. En 24 h será sustituido por el folículo F2 que ovulará a su vez inducido por el siguiente pico de LH. El F2 es sustituido por F3, y así sucesivamente. De este modo, diariamente, un folículo SYF deberá ser seleccionado e incorporado a la jerarquía como F5 para el mantenimiento de la jerarquía preovulatoria.

La selección de un SYF y su incorporación a la jerarquía preovulatoria está asociada a la diferenciación de sus células de la granulosa y a la entrada del SYF en la fase de crecimiento rápido. Este rápido crecimiento se debe a la masiva incorporación de vitelo y determina un incremento de peso desde  $\approx 0,03$  g a  $\approx 16$  g en el plazo de 6-7 días y un aumento de diámetro de 9 a 35-40 mm en ese mismo periodo (Johnson, 2015).

El mecanismo por el cual sólo un folículo SYF perteneciente al conjunto de folículos prejerárquicos es seleccionado diariamente para su incorporación al conjunto de 5-6 folículos jerárquicos ha sido objeto de estudio por diferentes autores. Las células de la teca en folículos de gallina expresan receptores FSHR y LHR. La expresión de estos receptores no

cambia significativamente a lo largo del desarrollo folicular y, además, estas células responden al estímulo FSH y LH *in vitro* mediante secreción de esteroides tanto antes como después de la selección folicular (Johnson *et al.*, 1996; Kowalski *et al.*, 1991; You *et al.*, 1996). Por el contrario, en las células de la granulosa sí se producen cambios sustanciales en su capacidad esteroidogénica durante el desarrollo folicular. La presencia de estos cambios ha orientado hacia estas células la atención en los trabajos de investigación sobre los mecanismos de selección folicular en aves (Johnson, 2015; Johnson y Woods, 2009; Johnson, 2012).

En gallina, las células de la granulosa comienzan a expresar el receptor FSHR (ARNm y proteína) en folículos de 1-2 mm. Esta expresión se mantiene durante el desarrollo folicular hasta alcanzar su máximo en las células de folículos jerárquicos F6/F5. A partir de ese momento, la expresión disminuirá hasta ser mínima en F1. La incubación de células de la granulosa con FSH no induce incremento de AMPc intracelular respecto a la concentración basal en células de folículos que aún no han sido seleccionados (SYF, 6-8 mm) a pesar de los altos niveles de expresión de FSHR (ARNm y proteína), pero este incremento en AMPc sí se produce inmediatamente tras la selección cuando las células de folículos F5 ( $\geq 9$ mm) se incuban con FSH (Kim *et al.*, 2013; Tilly *et al.*, 1991).

Sin embargo, la incubación de las células de la granulosa de folículos prejerárquicos con forskolina (activadora directa de actividad en adenilato ciclasa) induce la acumulación intracelular de AMPc, lo que demuestra la funcionalidad del sistema de señalización celular en la vía metabólica activada normalmente por la FSH a través de su receptor acoplado a proteína G. Como consecuencia, antes de la selección, las células de la granulosa permanecen en un estado considerado como indiferenciado desde el punto de vista esteroidogénico y los niveles de expresión de genes dependientes de AMPc como StAR (proteína reguladora de la

esteroidogénesis aguda), CYP11A (colesterol desmolasa) y de LHR, son prácticamente nulos (Johnson, 2015). El proceso de selección folicular de SYF a folículo preovulatorio jerárquico está relacionado con el inicio de respuesta mediada por AMPc tras la activación del receptor FSHR. La respuesta mediada por AMPc desencadenará la actividad esteroidogénica en las células de la granulosa de los folículos seleccionados en la jerarquía (Johnson, 2014).

FSH induce la expresión de sus propios receptores FSHR y los receptores LHR en células de la granulosa de folículos de 6-13 mm (Woods y Johnson, 2005). Sin embargo, la actividad de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y de proteína quinasa C (PKC), inducidas por ligandos del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mantienen bloqueada la expresión de StAR y la secreción de progesterona en las células de la granulosa de folículos prejerárquicos indiferenciados bajo estímulo FSH, mientras que la inhibición de estas actividades quinasa permite la expresión de FSHR, LHR StAR, y la esteroidogénesis inducida por FSH. Sin embargo, la actividad MAPK y PKC es necesaria para la esteroidogénesis en las células de la granulosa de folículos diferenciados preovulatorios (Woods *et al.*, 2007).

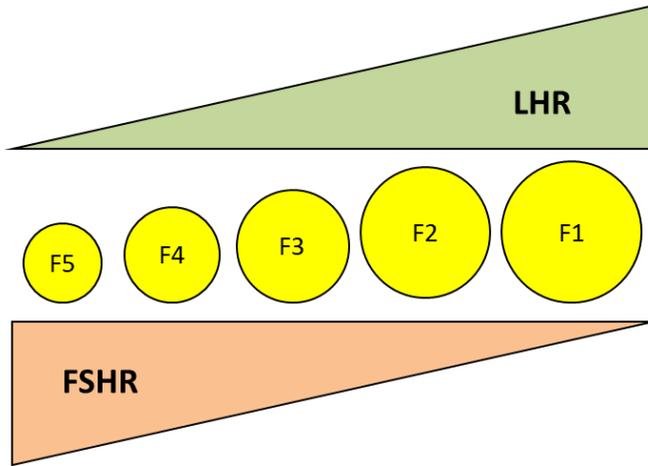
En mamíferos, el receptor FSHR pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR). La activación de FSHR, utiliza la vía clásica de activación de adenilato ciclasa (AC) con aumento de AMPc intracelular que induce la actividad de proteína quinasa A (PKA) que a su vez promueve la expresión génica (Gloaguen *et al.*, 2011). En aves, la activación de este receptor y la misma vía de señalización mediante AMPc y PKA induce y mantiene la expresión de StAR, CYP11A, y CYP17 (17 $\alpha$ -hidroxilasa) (Calvo y Bahr, 1983; Kowalski *et al.*, 1991).

La fosforilación del dominio intracelular es un conocido mecanismo para la inactivación de FSHR en mamíferos. Esta fosforilación se lleva a cabo

mediante quinasas (GRKs) de receptores asociados a proteína G. Una vez fosforilados los residuos serina y treonina del dominio intracelular de FSHR,  $\beta$ -arrestina se une a este dominio inhibiendo el acoplamiento de FSHR activado al sistema de proteína G y, por tanto, inhibiendo la señalización de FSHR (Reiter y Lefkowitz, 2006). La transfección de células de la granulosa de folículos prejerárquicos con ARN de interferencia (siARN) dirigido contra la secuencia de ARNm de  $\beta$ -arrestina1 (gallina), permite la acumulación de AMPc intracelular, la expresión de StAR y la secreción de progesterona inducidos por FSH (Kim y Johnson, 2018).

Por tanto, actualmente se hipotetiza que la eliminación del bloqueo de la vía de señalización de FSH a través de su receptor FSHR mediado por MAPK y  $\beta$ -arrestina, podría ser la base de la diferenciación celular del folículo prejerárquico para su selección y evolución a folículo jerárquico preovulatorio (Kim y Johnson, 2018).

Durante la fase de crecimiento rápido en la jerarquía, ocurren dos importantes fenómenos fisiológicos en el folículo. Por un lado, el cambio en la expresión de los receptores FSHR y LHR en las células de la granulosa de los folículos jerárquicos, con expresión máxima de FSHR en las células de F5 y mínima en F1, y expresión de LHR mínima en F5 y máxima en F1 (Zhang *et al.*, 1997). Por otro, la capacidad para la síntesis de progesterona de estas células también se incrementa en relación directa con su grado de madurez, siendo máxima en F1 tanto en ensayos *in vitro* (Hammond *et al.*, 1981; Hrabia *et al.*, 2014) como *in vivo* (Johnson *et al.*, 1987).



**Ilustración 7. Esquema representativo de la variación de FSHR y LHR en células de la granulosa de folículos ováricos preovulatorios durante su proceso de crecimiento y maduración.**

Por otra parte, la acumulación de vitelo en el ovocito se debe a la entrada en el mismo de vitelogenina y lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) fundamentalmente. El paso de estas dos macromoléculas a través de la capa de células de la granulosa hasta la membrana ovocitaria depende de transporte paracelular entre estas células (Perry y Gilbert, 1979). La expresión de ocludina (una proteína componente de las uniones estrechas intercelulares) es máxima (ARNm) en células de la granulosa de folículos de 1 mm de diámetro y disminuye (ARNm y proteína) durante el proceso de maduración folicular hasta ser mínima en folículos F1 (Stephens y Johnson, 2017). Esta disminución en su expresión explicaría la posibilidad de difusión paracelular e incorporación de vitelogenina y VLDL al vitelo ovocitario en la fase de crecimiento rápido folicular. Sin embargo, los mecanismos de regulación de la expresión de esta proteína en aves es desconocida actualmente.

La concentración plasmática de FSH experimenta fluctuaciones en relación al estado reproductivo en aves. En codorniz japonesa, la concentración plasmática de FSH aumenta tras ser sometida a un incremento

del fotoperiodo y permanece elevada durante el desarrollo folicular ovárico. De modo inverso, la disminución del fotoperiodo se asocia con descenso en los niveles plasmáticos de FSH y la involución ovárica (Henare *et al.*, 2012). En gallina, los niveles plasmáticos de FSH también sufren un incremento previo al inicio del ciclo de puesta. Sin embargo, estos niveles descienden una vez iniciada la puesta. Durante el ciclo de puesta, los niveles plasmáticos de FSH se mantienen constantes salvo un ligero incremento 12 horas antes de la ovulación. El patrón observado para concentraciones plasmáticas de LH es semejante al de FSH, aunque el incremento en los niveles de LH es previo al de FSH (Lovell *et al.*, 2001). El incremento en la concentración de LH también precede al desarrollo folicular en carbonero común (*Parus major*) (Schaper *et al.*, 2012) alcanzando su máximo en coincidencia con el periodo de puesta (Silverin *et al.*, 1997).

La administración de FSH en gallina induce el desarrollo de folículos LWF y SYF (Palmer y Bahr, 1992), y la administración de extractos glicoproteicos de hipófisis de pollo que contienen FSH y LH induce el desarrollo folicular completo en aves (Wakabayashi *et al.*, 1992). Todos estos datos sugieren que, como en mamíferos, el desarrollo y maduración folicular son inducidos y regulados por las gonadotropinas.

### **1.2.3.3. Atresia**

En vertebrados, la atresia folicular ovárica representa la muerte del folículo, mediada por apoptosis, en cualquiera de sus fases de desarrollo (Tilly *et al.*, 1991).

La atresia folicular en aves es un mecanismo fisiológico frecuente en folículos prejerárquicos, e infrecuente en folículos preovulatorios (jerárquicos). Consecuentemente, la jerarquía de folículos preovulatorios es resultado del número de folículos que entra en fase de crecimiento ( $\approx 1$  mm)

y del porcentaje de atresia durante su desarrollo hasta 8-9 mm (momento en que pasan a formar parte de la jerarquía preovulatoria). El ritmo de crecimiento folicular en gallina ha sido estudiado en detalle a partir de los 3 mm de diámetro:

- De 3 a 5 mm: 3 días
- De 5 a 8 mm: 2 días
- De 8 mm hasta la ovulación: 6 días

Dado este ritmo de crecimiento, y que en el ovario de gallina en ciclo de puesta existen alrededor de 60 folículos de diámetro comprendido entre 3 y 8mm, resulta verosímil que, hasta su entrada en la jerarquía, los folículos tengan una alta probabilidad de entrar en proceso de atresia. Además, en la exploración del ovario, la presencia de entre 10 y 15 (máximo de 30) folículos atrésicos de diámetro inferior a 8 mm es la norma (Gilbert *et al.*, 1983).

De este modo, el número de folículos preovulatorios dependerá del equilibrio entre el número de folículos que entren en la fase de crecimiento y acumulación de vitelo (1-8 mm) y el número de folículos que entren en atresia durante esta fase de desarrollo.

En gallinas de 80-90 semanas (“viejas”), en las que existe menor número de folículos preovulatorios y de 3-8 mm que en gallinas jóvenes, y un mayor número de folículos atrésicos de diámetro inferior a 8 mm, el tratamiento con FSH o gonadotropina coriónica equina (con actividad FSH en aves) aumenta el número de folículos LWF y SWF y disminuye el número de folículos atrésicos (Palmer y Bahr, 1992).

La hipofisectomía en gallinas en ciclo de puesta tiene como consecuencia la atresia de todos los folículos ováricos jerárquicos y prejerárquicos en un periodo de 24 horas. Sin embargo, el 100% de los folículos F1 sufre atresia en el transcurso de 18 h (Opel y Nalbandov, 1961b). Este efecto puede ser en parte revertido mediante la administración de adenohipófisis de pollo desecadas con acetona, pulverizadas y diluidas en suero fisiológico

(Mitchell, 1967a). Estos experimentos sugieren una relación de dependencia de los folículos ováricos respecto al estímulo gonadotropo.

Sin embargo, por otro lado, la administración intravenosa de 50 µg de LH de origen ovino en gallina en ciclo de puesta induce la atresia del folículo F1 o de los folículos F1 y F2 si se administra 8,5 h tras la ovulación, cuando aún no poseen la madurez suficiente para ovular en respuesta a LH (Gilbert *et al.*, 1981).

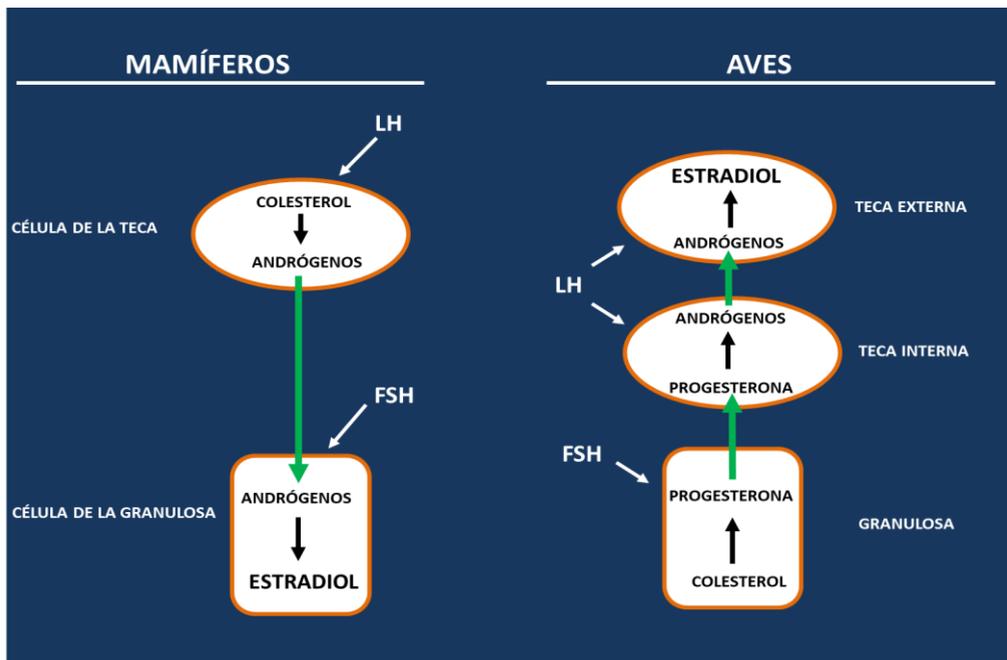
En aves, los folículos preovulatorios atrésicos son fácilmente distinguibles por la presencia de hemorragia submesotelial en su superficie y por su aspecto irregular y descolorido a simple vista, mientras que, por ecografía, son distinguibles por su aspecto hiperecogénico (Bronneberg y Taverne, 2003; Navara *et al.*, 2015; Ramasamy Manickam *et al.*, 2014).

#### 1.2.3.4. Esteroidogénesis

En hembras de aves, como en mamíferos, el ovario, en su función endocrina, es la principal fuente de esteroides sexuales (Huang *et al.*, 1979; Huang y Nalbandov, 1979).

En mamíferos, durante la fase folicular, los andrógenos sintetizados por las células de la teca son convertidos a estradiol en las células de la granulosa según la teoría “dos células, dos hormonas”. Las células de la teca, bajo el estímulo de la LH, sintetizan andrógenos que difunden a las células de la granulosa donde, por efecto de la expresión de aromatasa inducida por FSH, son aromatizados a estradiol (Havelock *et al.*, 2004), aunque la elevada expresión de receptores LHR en células de la granulosa al final de la fase folicular permite la síntesis y secreción de estradiol bajo estímulo LH en folículos dominantes (Hillier *et al.*, 1994).

En aves, se ha propuesto repetidamente la existencia de un “modelo de tres células” para la esteroidogénesis en folículos preovulatorios. Según este modelo, la progesterona es sintetizada en las células de la granulosa y resulta convertida a testosterona en las células de la teca interna. A su vez, las células de la teca externa convertirán la testosterona en estradiol gracias al proceso de aromatización (Nitta *et al.*, 1991b; Porter *et al.*, 1989).



**Ilustración 8. Modelos de esteroidogénesis ovárica en mamíferos y aves.**

Según el modelo de dos células-dos hormonas en mamíferos, bajo el estímulo de la LH, las células de la teca sintetizan y secretan andrógenos que difunden a la granulosa donde, bajo el efecto de la FSH, son aromatizados a estradiol. En el modelo de tres células de folículos preovulatorios de aves, se sintetizaría y secretaría progesterona en las células de la granulosa bajo el estímulo FSH. Esta progesterona, difundiría a la teca interna donde sería convertida a andrógenos bajo el efecto LH. A su vez, los andrógenos serían convertidos a estradiol en la teca externa también bajo el efecto inductor de LH.

La principal fuente de estradiol en gallina son los folículos de pequeño tamaño (1-8 mm) y las células del estroma ovárico (Senior y Furr, 1975). De hecho, las células del estroma ovárico secretan progesterona, androstendiona y estradiol cuando son incubadas *in vitro* con LH de origen ovino (Levorse y Johnson, 1994).

Los folículos de tamaño comprendido entre 1 y 10 mm secretan androstendiona y estradiol en respuesta a estímulo LH *in vitro* (Robinson y Etches, 1986). Sin embargo, la estimulación de estos folículos con FSH resulta en nula o muy escasa secreción de androstendiona y estradiol (Robinson *et al.*, 1988).

La escasa o nula secreción de progesterona por las células de la granulosa de folículos inmaduros no impide la secreción de androstendiona y estradiol en estos folículos. Por tanto, las células de la teca no utilizarían la progesterona secretada por las células de la granulosa como sustrato para la síntesis de androstendiona y estradiol, contradiciendo el modelo “tres células”. Estos datos sugieren que las células de la teca serían capaces de realizar el proceso esteroideogénico completo (desde colesterol a estradiol) en los folículos inmaduros prejerárquicos, mientras el modelo “tres células” sería válido en folículos jerárquicos (Robinson y Etches, 1986). Esta hipótesis se refuerza por la expresión de CYP11 (citocromo P450<sub>scc</sub>), que convierte el colesterol en pregnenolona al inicio de la esteroideogénesis, en las células de la teca de folículos de 1 mm, de 2-4 mm y de 5-10 mm (Nitta *et al.*, 1991a).

En el folículo F1, las células de la granulosa alcanzan la máxima capacidad de síntesis y secreción de progesterona, mientras en las células de la teca de este folículo, la síntesis y secreción de andrógenos y estradiol disminuye. En células de la teca, la expresión de aromatasa (CYP19) es mínima en folículos F1. Dado que el estradiol inhibe la secreción de progesterona en las células de la granulosa, la disminución de la secreción de estradiol en la teca del folículo F1 podría tener un papel permisivo en las

células de la granulosa para la síntesis y secreción masivas de progesterona. Esta secreción de progesterona es necesaria para la inducción de la oleada preovulatoria de LH (Johnson *et al.*, 1988; Lee y Bahr, 1990).

En resumen, la principal fuente de estradiol en gallina son los folículos prejerárquicos, mientras la progesterona es secretada, fundamentalmente, por los folículos jerárquicos preovulatorios (Hu y Zadworny, 2017).

### 1.2.3.5. Vitelogénesis

En aves, el ovocito primario, detenido en la fase de diplotene de la primera división meiótica, se caracteriza por una elevada actividad transcripcional cuando entra en la fase de crecimiento lento. En esta fase, el ovocito sintetiza los componentes necesarios para el desarrollo embrionario inicial (ribosomas, ARNt, orgánulos citoplásmicos, etc.) (Schneider, 2016).

Durante la fase de crecimiento rápido (6-7 días), el ovocito incorpora vitelo masivamente. El vitelo está compuesto fundamentalmente por agua (48%), lípidos (33%) y proteínas (17%) (Lilienthal *et al.*, 2015).

El 30% de la masa de vitelo es incorporado como partículas lipoproteicas de vitelogenina (VTG) y lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). Tanto VTG como VLDL son sintetizadas en el hígado y su expresión es inducida por estradiol (Bujo *et al.*, 1994; Deeley *et al.*, 1977; Ratna *et al.*, 2016).

La incorporación al ovocito de VTG y VLDL está mediada por un único receptor de membrana que facilita el proceso de endocitosis de estas lipoproteínas. Este receptor, homólogo a los receptores de VLDL (VLDLR) en mamíferos, recibe la denominación de LR8 en aves. De este modo, VTG y VLDL aportan 5 g de triglicéridos y 230 mg de colesterol a la masa del vitelo (Schneider, 2009).

VTG es hidrolizada en el ovocito, resultando de esta hidrólisis (fundamentalmente) dos proteínas: fosvitina y lipovitelina (Richards, 1997; Stifani *et al.*, 1990). Estas proteínas resultantes, junto a VLDL, son almacenadas en glóbulos o microsferas rodeadas de membrana fosfolipídica en el vitelo (Parshad *et al.*, 2008).

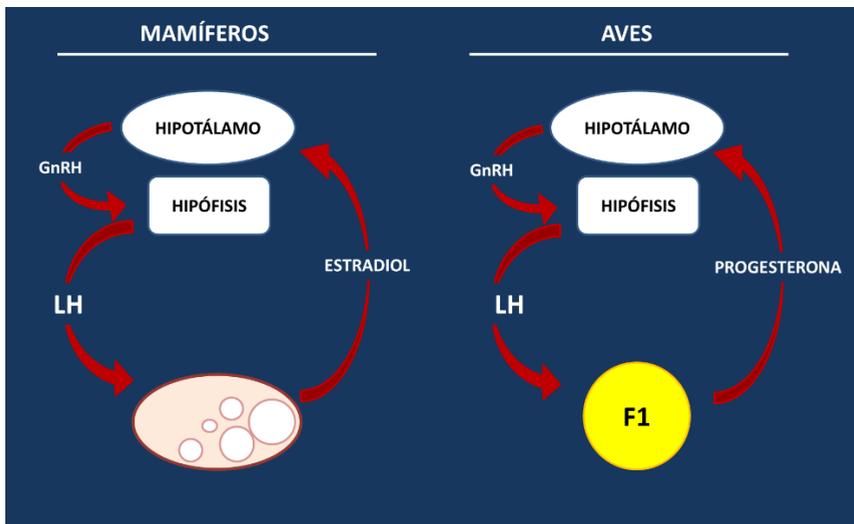
### **1.2.3.6. Ovulación**

La ovulación del folículo maduro F1 es inducida por la oleada preovulatoria de LH liberada por la adenohipófisis. Durante la ovulación, la ruptura de la pared folicular a lo largo del estigma se produce por la activación de proteasas que reducen la resistencia de la pared folicular, por el incremento de la presión intrafolicular debido al incremento de flujo sanguíneo en el folículo, y por la contracción de las células del músculo liso de la pared folicular. A nivel celular, el inicio de la rotura de la vesícula germinal coincide con el pico de LH, mientras que la extrusión del primer corpúsculo polar se completa entre 1 y 2,5 h previas a la ovulación (Johnson y Woods, 2007).

En gallina en ciclo de puesta, la concentración plasmática de LH experimenta un incremento en las 4-7 horas previas a la ovulación. Este incremento en los niveles de LH es acompañado por una elevación paralela de la concentración de progesterona plasmática. El incremento en la concentración de progesterona plasmática ejerce un efecto de retroalimentación positiva sobre la liberación de LH que, a su vez, induce la liberación de progesterona y así sucesivamente hasta el pico de máxima concentración de LH. La ovulación se produce habitualmente una hora tras la oviposición, por lo que las oleadas de LH y progesterona suceden en las 3-6 horas previas a la puesta (Etches y Cunningham, 1976; P. A. Johnson *et al.*, 1985; Ottinger y Bakst, 1995).

La administración de GnRH-I o de progesterona en codorniz en ciclo de puesta, induce la ovulación prematura del folículo F1. Estos resultados sugieren que el incremento de progesterona induciría la liberación hipotalámica de GnRH-I y este, a su vez, la de LH. Por tanto, la retroalimentación positiva entre progesterona y LH pudiera estar mediada por GnRH-I (Onagbesan y Peddie, 1988).

Este sistema de retroalimentación positiva sería homólogo al observado en mamíferos, en que el estradiol induce la secreción de la oleada preovulatoria de LH (Dafopoulos *et al.*, 2006; Kesner *et al.*, 1981; Schwartz, 1969).



**Ilustración 9. Imagen ilustrativa de los mecanismos reguladores de la oleada de LH y ovulación en mamíferos y aves.**

En mamíferos, el incremento en las concentraciones plasmáticas de estradiol secretado por los folículos dominantes desencadena la liberación de GnRH hipotalámica que induce la liberación de LH. En aves, es la progesterona liberada por el Folículo F1 la que desencadena la secreción de GnRH y LH.

Además, los niveles de testosterona plasmática también experimentan un incremento en las 8-10 horas previas a la ovulación. La inmunización activa

o pasiva frente a testosterona bloquea el ciclo ovulatorio sin producir disrupción de la jerarquía folicular. En ensayos *in vitro*, la testosterona induce la expresión de StAR, P450<sub>scc</sub> (CYP11), LHR y la secreción de progesterona en respuesta a LH en células de la granulosa de folículos F1. Todos estos datos sugieren un papel fundamental del incremento de la testosterona plasmática que facilitaría el mecanismo preovulatorio de retroalimentación positiva entre progesterona y LH (Croze y Etches, 1980; Rangel *et al.*, 2005; Rangel *et al.*, 2009).

La función del folículo postovulatorio en aves no está claramente definida. Sin embargo, su exéresis quirúrgica tras la ovulación se asocia a un retraso en la puesta del huevo correspondiente a la ovulación de este folículo (K. Tanaka y Nakada, 1974).

## **1.2.4. Formación del huevo y oviposición**

### **1.2.4.1.1. Oviducto**

---

El oviducto en aves es una estructura muscular tubular cuya cavidad está revestida por epitelio glandular.

Anatómica y funcionalmente pueden diferenciarse cinco regiones bien diferenciadas: infundíbulo, magnum, istmo, útero (o glándula cascarógena) y vagina (Kawashima *et al.*, 1996).

En función del estado reproductivo, el oviducto experimenta drásticos cambios de tamaño y peso. En gallina sexualmente inmadura, el peso del magnum es de alrededor de 10 mg, mientras en ciclo reproductivo alcanza los 40 g.

En etapa reproductiva, las funciones del oviducto son:

- Tras la ovulación, captación del óvulo en el infundíbulo, donde tiene lugar la fecundación. Tras la llegada del óvulo al interior del infundíbulo, la mucosa infundibular secreta una capa proteica denominada membrana perivitelina externa que rodea al óvulo o al cigoto.
- Adición del albumen (clara) alrededor del óvulo fertilizado en el magnum.
- Formación de las membranas de la cáscara en el istmo.
- Formación de la cáscara en la glándula cascarógena (útero).
- Almacenamiento de espermatozoides en la unión útero-vaginal.

El desarrollo oviductal durante el periodo reproductivo depende fundamentalmente de la actividad de hormonas sexuales esteroideas, y en especial de la exposición de este órgano a estrógenos. Bajo el efecto del estradiol, el epitelio oviductal se transforma en epitelio tubular glandular. Este epitelio glandular sintetiza y secreta la mayoría de las proteínas del albumen (ovoalbúmina, ovotransferrina, ovomucoide, avidina, etc.) a través de la transcripción inducida por actividad estrogénica mediada por el receptor ER $\alpha$  (Dougherty y Sanders, 2005; Kawashima *et al.*, 1996; Oka y Schimke, 1969).

La administración de estradiol en gallinas induce la expresión de ovoalbúmina en el transcurso de 18 horas (Palmiter y Wrenn, 1971). La lisozima, otra proteína característica del albumen y a la que se atribuye actividad antimicrobiana por su capacidad para hidrolizar peptidoglicanos de la pared de bacterias gram positivas, también es expresada y secretada por la acción de los estrógenos sobre las células de las glándulas oviductales del magnum (Callewaert y Michiels, 2010; Oka y Schimke, 1969).

El paso del óvulo por el magnum y la secreción del albumen asociada, tienen una duración aproximada de tres horas en gallina (Moynihan y Edwards, 1975). Durante este periodo, la periferia de esta estructura

(albumen) rota sobre su eje central. Sin embargo, la yema (óvulo/cigoto) permanece estático. Como resultado, fibras proteicas del albumen situadas en el eje longitudinal del huevo sufren enrollamiento dando lugar a las chalazas, una estructura gelatinosa de aspecto helicoidal que sujeta al óvulo en posición central (Rahman *et al.*, 2007).

En el istmo se formarán las membranas de la cáscara. Ambas están compuestas por un entramado de fibras glicoproteicas y se hallan íntimamente unidas salvo en el polo obtuso del huevo, donde ambas se separan permitiendo la formación de la cámara de aire. En el útero o glándula cascarógena se produce el depósito por precipitación de sales de calcio en forma de calcita ( $\text{CaCO}_3$ ) sobre proteoglicanos y otras glicoproteínas. Este proceso tiene una duración aproximada de 20 horas en gallina (Nys *et al.*, 2004).

#### 1.2.4.1.2. Oviposición

---

Tras su calcificación, la puesta del huevo es llevada a cabo por la contracción de la musculatura lisa oviductal inducida por arginina vasotocina (AVT). AVT es un péptido ortólogo de arginina vasopresina (AVP) de mamíferos y secretada por la neurohipófisis en aves. Sus niveles plasmáticos sufren un drástico incremento inmediatamente antes de la oviposición, y su administración parenteral induce la misma. La mesotocina (homóloga a oxitocina en mamíferos), y también liberada por la neurohipófisis en aves, incrementa la sensibilidad de la musculatura oviductal a AVP (Koike *et al.*, 1988; Takahashi y Kawashima, 2008).

### 1.2.5. Fecundación

Las aves poseen la propiedad de almacenar espermatozoides con capacidad fecundante durante semanas e incluso meses. El lugar de almacenamiento de espermatozoides en aves se encuentra en la unión útero-vaginal, donde existen invaginaciones del epitelio glandular especializadas en esta función. Estas estructuras se denominan túbulos o glándulas de almacenamiento de espermatozoides (SST por sus siglas en inglés). En estos especializados túbulos, los espermatozoides pueden sobrevivir, con capacidad fecundante, durante 2-15 semanas en función de la especie (Stepinska y Bakst, 2007).

Los espermatozoides así almacenados, abandonan estos túbulos secuencialmente para ascender por el oviducto hasta el infundíbulo. La liberación de espermatozoides desde los túbulos es inducida por progesterona. Dado que los incrementos en la concentración de progesterona plasmática son cíclicos cada 24-26 h y previos (4-6 horas) a la ovulación, los espermatozoides que abandonen los túbulos poseerán un “tiempo de gracia” de alrededor de cinco horas para alcanzar el infundíbulo sin el obstáculo de un huevo descendente en el oviducto, ya que la ovulación se produce una hora tras la oviposición (en gallina) (Sasanami *et al.*, 2013).

En aves, la fertilización del óvulo se produce en los 15 minutos posteriores a la ovulación. El lugar de fertilización es el infundíbulo oviductal. En esta región del oviducto se forma la membrana perivitelina externa (proteica). Dado que esta membrana es impermeable al paso de espermatozoides y que se forma en el plazo de minutos tras la llegada del óvulo al infundíbulo, los espermatozoides localizados en este deberán fertilizar el óvulo antes de la completa formación de esta membrana (Stepinska y Bakst, 2007).

En mamíferos, los espermatozoides deben adquirir la capacidad fecundante mediante determinados cambios en su fisiología adquiridos en su paso por el tracto genital femenino. Estos cambios, entre los que se encuentra la capacidad de reacción acrosómica reciben el nombre de capacitación (Kopf *et al.*, 1999; Puga Molina *et al.*, 2018; Tulsiani *et al.*, 1998).

Sin embargo, en aves, se considera que no existe un fenómeno específico de capacitación. La fertilización *in vitro* mediante la adición de esperma fresco sobre la vesícula germinal provoca la fecundación y desarrollo embrionario en gallina y codorniz (Nakanishi *et al.*, 1990; Olszanska *et al.*, 2002). Además, la inseminación artificial en gallinas en los quince minutos posteriores a la oviposición fertiliza el huevo puesto 25 horas más tarde. Dado que la ovulación se produce alrededor de una hora tras la puesta, estos espermatozoides cuentan con escasos minutos ( $\approx 30-45$ ) para atravesar el oviducto y encontrarse en el infundíbulo en condiciones fecundantes (Bohr *et al.*, 1964).

Otra importante característica biológica de la fertilización en aves es la fecundación polispermica. En gallina, el máximo porcentaje de huevos fertilizados se da cuando seis o más espermatozoides penetran en el disco germinal (Wishart, 1997). La inyección intracitoplasmática en el disco germinal de un único espermatozoide resulta en fertilización en codorniz, pero el desarrollo embrionario no progresa más allá de estadios iniciales. Sin embargo, la inyección de un único espermatozoide acompañada de pequeñas cantidades de extracto espermático (2 ng) que contiene fosfolipasa C (PLCZ), aconitato hidratasa y citrato sintasa, induce desarrollo embrionario normal. Según estos estudios, el número de espermatozoides necesarios para la activación del óvulo aviar y el posterior desarrollo embrionario es próximo a veinte (aunque no todos penetrarán en el disco germinal) (Mizushima *et al.*, 2014).

En el momento de la oviposición, y en función de la especie, el disco germinal se ha transformado en una estructura embrionaria multicelular con 20.000-60.000 células (Jacob y Bakst, 2007a).

### 1.3. ANTECEDENTES EN INDUCCIÓN DEL DESARROLLO FOLICULAR OVÁRICO Y OVULACIÓN EN AVES MEDIANTE GONADOTROPINAS

En 1942, Fraps & Riley aportaron la primera evidencia científica sobre inducción de la ovulación mediante un preparado hormonal en gallinas. Los efectos de la administración diaria de gonadotropina coriónica equina (eCG) en gallinas en ciclo de puesta (marcado crecimiento folicular y cese de la ovulación alrededor del 4º día de tratamiento) eran conocidos desde 1935. En este experimento, se trató a las gallinas con 200 UI de eCG y, a partir del 6º día, se administró por vía intravenosa una preparación de LH obtenida por fraccionamiento de hipófisis de caballo que indujo la inducción de la ovulación mediante LH de origen equino en las gallinas tratadas con eCG (Fraps y Riley, 1942).

Posteriormente, Das y Nalbandov utilizaron gonadotropinas de origen ovino y polvo de adenohipófisis de pollo para su administración en gallinas prepuberales. Las gonadotropinas de origen ovino no indujeron desarrollo folicular, mientras que el polvo hipofisario de origen aviar sí lo indujo, aunque no se consiguió la maduración folicular completa (Das y Nalbandov, 1955).

Dos años después, en 1957, Taber *et al.* publicaron los resultados obtenidos tras administración de polvo hipofisario de pollo en gallinas durante sus primeros días tras la eclosión (1-35 y 1-90 días). En los animales tratados diariamente durante los días 1-35, no se observó desarrollo folicular significativo, pero sí en los tratados durante los días 1-90. Dado que el tratamiento no consiguió desarrollo folicular en los días 1-35, otros dos grupos experimentales recibieron polvo hipofisario durante los días 30-65 y 60-150. En estos dos últimos grupos también se produjo desarrollo folicular

y el número de folículos de diámetro 2-17 mm y  $\geq 17$  mm fue superior a los de los grupos control. Tanto en el grupo tratado durante los días 60-150 como en su respectivo control, se registraron dos oviposiciones en cada uno (Taber *et al.*, 1958).

En 1961, Opel y Nalbandov publicaron los resultados tras la administración de FSH de mamífero (no especificado), eCG y polvo hipofisario de pollo (CAP) para inducir el crecimiento folicular en gallinas hipofisectomizadas en ciclo de puesta. FSH y eCG indujeron un desarrollo excesivo de folículos de pequeño tamaño, con degeneración atrésica de los mismos en el 8º día. CAP indujo el desarrollo folicular completo a dosis de 4 mg/día. Además, durante los días 7º y 8º del experimento, la administración intravenosa de LH (2 mg) o CAP (0,5 mg), fue capaz de inducir la ovulación en las gallinas tratadas diariamente con CAP. Por tanto, el tratamiento con CAP fue capaz de inducir el desarrollo folicular durante 8 días hasta su maduración total (Opel y Nalbandov, 1961a).

También en 1961, Opel y Nalbandov describen la capacidad de inducción de la ovulación mediante la administración de LH en gallinas hipofisectomizadas durante su ciclo de puesta. La hipofisectomía se realizó 18 horas previas a la siguiente ovulación prevista. La administración de LH (4 mg, origen no especificado) durante las primeras 6 horas tras la hipofisectomía indujo la ovulación en todos los individuos. Además, entre las 3 y 15 horas posthipofisectomía, la administración de LH indujo ovulaciones múltiples en aproximadamente la mitad de las gallinas tratadas. Los autores mencionan además que, en trabajos realizados previamente, la administración conjunta de LH y FSH inhibe la actividad ovulatoria de LH aislada en gallina hipofisectomizada. De este modo, se sugiere que el descenso de concentración de FSH plasmática en las horas siguientes a la hipofisectomía sensibilizaría a los folículos (incluso no destinados a ovular en función de su inmadurez) al efecto ovulatorio de la LH (Opel y

Nalbandov, 1961). Estos resultados podrían ser contradictorios con los obtenidos en trabajos de los mismos autores que utilizan polvo adenohipofisario de pollo (que presumiblemente contiene FSH y LH) como inductor de la ovulación (Opel y Nalbandov, 1961a). Sin embargo, la diferencia en actividad FSH entre el CAP y la FSH utilizados, podría explicar este fenómeno.

En 1967, Margaret E. Mitchell publicó un interesante trabajo en el que, a diferencia de los previos, la administración del tratamiento gonadotropo se inició en gallinas con ovarios en estado de total regresión 14 días tras la hipofisectomía. El tratamiento se administró en forma de polvo de adenohipófisis de pollo obtenido tras deshidratación de las mismas con acetona y pulverización. La administración del equivalente a 40 adenohipófisis diarias (50 mg) durante 12 días dio como resultado un desarrollo folicular semejante al fisiológico en la mitad de los individuos tratados, aunque se comprobó una tendencia a la hiperestimulación ovárica (mayor número de folículos jerárquicos que en condiciones fisiológicas). Además, uno de los individuos tratados puso un huevo normal el día anterior a la necropsia y, en esta, se encontraron folículos postovulatorios en tres individuos (Mitchell, 1967a). Es importante señalar que, en este mismo experimento, las dosis de 10 y 20 mg de polvo de adenohipófisis no indujeron el desarrollo folicular completo. Las dosis eficaces en este tratamiento fueron superiores (50 mg/día) a las utilizadas por Opel y Nalbandov (4 mg) aunque estos últimos autores comenzaron el tratamiento inmediatamente tras la hipofisectomía (Opel y Nalbandov, 1961a).

En el mismo año (1967), Mitchell publicó los resultados obtenidos tras la administración de extracto glicoproteico hipofisario en gallinas maduras en estado de regresión ovárica tras hipofisectomía o tratamiento con metaliburo, un inhibidor no esteroideo de la función gonadotropa hipofisaria mediante la inhibición de la liberación de GnRH (Kesner *et al.*,

1987). La administración de 2 mg /día (resultante de la extracción de alrededor de 50 adenohipófisis) de este extracto durante 12-14 días, obtuvo efectos similares a los del experimento anterior en gallinas hipofisectomizadas. En la necropsia, se puso de manifiesto una tendencia a la hiperestimulación ovárica de folículos prejerárquicos y jerárquicos de tamaño inferior al F1. Los resultados de este experimento indican que la gran mayoría de la actividad gonadotropa de la adenohipófisis se conserva en este extracto glicoproteico (Mitchell, 1967b).

En 1970, la misma autora administró una fracción del extracto glicoproteico con presencia predominante de FSH y escasa presencia LH. Esta fracción, obtenida por cromatografía de intercambio iónico y denominada CM-1, se administró a gallinas maduras hipofisectomizadas tanto inmediatamente tras la hipofisectomía como tras la regresión ovárica inducida por la misma. En el caso de la administración inmediata tras hipofisectomía, CM-1 retrasó los fenómenos de regresión ovárica. En el caso de ovarios regresados, CM-1 apenas indujo desarrollo folicular y, tras su administración durante 11 y 14 días, no se encontraron en la necropsia folículos ováricos de diámetro superior a 5 mm (Mitchell, 1970).

En 1972 y 1973, Imai publicó resultados de experimentos semejantes a los obtenidos previamente por Mitchell. De nuevo, el polvo obtenido de adenohipófisis desecadas de pollo, el extracto glicoproteico de este polvo, y fracciones obtenidas mediante cromatografía de intercambio iónico a partir del extracto, se utilizaron para valorar su efecto en la inducción del desarrollo folicular tras regresión ovárica inducida por metaliburo o mediante ayuno de 3-5 días. La acción de estos preparados se comparó con la de gonadotropinas de mamíferos: FSH y LH de origen ovino y polvo hipofisario bovino. En el caso de los animales tratados con metaliburo, los preparados hormonales de aves indujeron el desarrollo folicular, aunque estos animales presentaron tendencia a la hiperestimulación, con

abundantes folículos amarillos de más de 9 mm de diámetro en los grupos tratados con dosis más altas. En los animales tratados con dosis inferiores, el desarrollo ovárico fue escaso, mientras que los tratamientos con hormonas de origen bovino u ovino no indujeron el desarrollo de folículos de más de 9 mm. En los animales tratados con los preparados hormonales de pollo, la concentración de vitelogenina plasmática sufrió un incremento a partir del tercer día de tratamiento, pero no en los individuos tratados con gonadotropinas de mamífero. En los grupos sometidos a ayuno los resultados fueron semejantes (Imai, 1972).

En el trabajo publicado en 1973, Imai presentó los resultados de la administración de polvo de tejido adenohipofisario de pollo (CAP), como agente inductor de la ovulación en gallina en ciclo de puesta pretratada con 75 UI eCG/24 h. Con esta dosificación de eCG, la puesta en gallina cesa habitualmente entre 4-8 días tras la primera dosis. En experimentos previos, en la necropsia tras 3 días del cese de la puesta se observó la presencia de 4-7 folículos preovulatorios de gran tamaño sin signos de atresia. La administración de CAP indujo  $3,7 \pm 0,7$  ovulaciones por individuo en los grupos que recibieron dosis de 10-20 mg. Estos resultados pusieron de manifiesto la capacidad de CAP para inducir la ovulación de folículos ováricos maduros en gallina (Imai, 1973).

Palmer y Bahr (1992), administraron FSH porcina y eCG en gallinas de más de 80 semanas ("viejas"). En este tipo de animales, el número de huevos puestos por secuencia es inferior al de gallinas más jóvenes. Este hecho se atribuye a un menor número de folículos en la jerarquía: 5-7 en gallinas jóvenes frente a 4 en gallinas de más de 80 semanas de edad. Otro cambio observado en gallinas de más de 80 semanas es el menor número de folículos de diámetro  $\geq 3$  mm y un mayor número de folículos atrésicos de 3-8 mm de diámetro. Dado que la jerarquía folicular se forma a partir de estos folículos de menor tamaño (6-9 mm), la causa de esta disminución del

número de folículos jerárquicos podría deberse tanto a la menor proliferación de folículos menores como a una mayor incidencia de atresia en los mismos. La administración de FSH porcina a estos animales resultó en un incremento de progesterona y estradiol plasmáticos, un incremento en el número de folículos LWF y SYF, y una menor incidencia de atresia en los mismos sin interrupción de la jerarquía folicular. eCG también indujo cambios semejantes a FSH, aunque sí produjo interrupción de la jerarquía folicular (Palmer y Bahr, 1992).

También en 1992, Wakabayashi *et al.* publicaron los resultados de un trabajo experimental en inducción del desarrollo folicular ovárico y ovulación en codorniz japonesa mediante extracto glicoproteico de adenohipófisis de pollo. En este caso, los individuos tratados fueron codornices prepuberales de 6 semanas de edad y mantenidas en condiciones de fotoperiodo corto de 8 horas diarias de luz y 16 de oscuridad (8L: 16O). En estas condiciones, los individuos del grupo control mantienen su ovario en total inactividad. El tratamiento se administró en forma de extracto glicoproteico de adenohipófisis de pollo mediante bombas osmóticas subcutáneas de liberación continua durante 14 días. Entre las dosis empleadas, la de 12 µg de extracto por hora indujo desarrollo hasta la madurez folicular. La administración de inyecciones intramusculares de 500 µg de extracto en los días 12 o 14 tras la implantación de las bombas indujo la ovulación en 5 de las 14 hembras tratadas, y tres de las mismas pusieron huevos. La dosis administrada de FSH y LH administrada en infusión continua y calculada por radioinmunoensayo fue estimada en 0,12 y 0,86 µg/h respectivamente (Wakabayashi *et al.*, 1992).

El desarrollo folicular inducido mediante administración de eCG en codornices prepúberes también ha sido descrito. La administración de diferentes dosis y protocolos ha dado como resultado el desarrollo ovárico hasta la madurez folicular y puesta de huevos. Sin embargo, la variabilidad

individual en la respuesta al tratamiento, la tendencia al desarrollo de un número suprafisiológico de folículos preovulatorios y el bajo porcentaje de individuos (máximo del 25%) tratados que ponen huevos, sugieren la conveniencia de ulteriores trabajos de investigación para la mejora de protocolos destinados a la inducción del ciclo reproductivo en hembras de aves (Bennett, 2002).

## 1.4. GONADOTROPINAS RECOMBINANTES

La utilización de gonadotropinas recombinantes en la inducción de la maduración folicular se ha generalizado durante los últimos veinticinco años en la aplicación de métodos de reproducción asistida en humanos (Devroey *et al.*, 1992).

La producción de FSH recombinante para su uso en reproducción asistida en humanos se basa en la expresión de esta hormona en cultivos celulares de células de ovario de hámster chino (CHO). La expresión en este sistema está condicionada por las características moleculares propias de las gonadotropinas y las modificaciones postraduccionales que deben tener lugar en las cadenas aminoacídicas de la FSH necesarias para la obtención de un perfil farmacocinético y farmacodinámico eficaz (Carillo *et al.*, 2017).

La correcta glicosilación de las gonadotropinas es fundamental para la unión de sus monómeros y la formación del dímero  $\alpha$ - $\beta$  (Ren, Sairam, & Yarney, 1995). Además, la glicosilación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  es determinante en la capacidad de unión de esta hormona a su receptor y a la activación del mismo (Calvo *et al.*, 1986; Flack *et al.*, 1994; Galway *et al.*, 1990).

Por otra parte, la glicosilación de las subunidades de la FSH determina su vida media plasmática. Esta hormona presenta un número variable de potenciales sitios de N-glicosilación (Asparragina-X-Serina/Treonina) en diferentes especies. Las N-glicosilaciones se caracterizan por la unión de una molécula de N-acetil glucosamina (GlcNac) al grupo amida del aminoácido asparragina. El oligosacárido resultante de esta glicosilación puede terminar (“capping”) tanto en una molécula de ácido siálico unida a residuo galactosa como en la sulfonación de N-Acetil galactosamina (SO<sub>3</sub>-GalNac) (Green y Baenziger, 1988).

En los oligosacáridos ligados a la FSH secretada por la adenohipófisis en humanos son más abundantes las terminaciones con residuos de ácido siálico que los de SO<sub>3</sub>-GalNac. Esta circunstancia determina la vida media de la hormona, ya que el incremento del número de residuos ácido siálico en FSH determina una mayor vida media plasmática que la de las moléculas con mayor número de SO<sub>3</sub>-GalNac (Wide *et al.*, 2009). Este fenómeno es atribuido a la existencia de un receptor para SO<sub>3</sub>-GalNac localizado en el endotelio de los capilares hepáticos y las células de Kupffer que internaliza el ligando y lleva a cabo el aclaramiento plasmático del mismo (Fiete *et al.*, 1991). Las células CHO, realizan eficazmente la sialización terminal de los oligosacáridos de FSH (D'Antonio *et al.*, 1999).

La necesidad de modificaciones postraduccionales en la molécula de FSH que la doten de las características farmacocinéticas y la actividad biológica para su aplicación *in vivo* hacen imprescindible la utilización de un sistema de expresión de proteínas en células de mamífero. La expresión en sistemas procariontes (*E. coli*) ha sido descartada por su incapacidad para llevar a cabo la glicosilación de esta hormona (Brooks, 2004; Costa *et al.*, 2014; Dingermann, 2008). La expresión en hongos como *Pichia pastoris* presenta el inconveniente de un patrón de glicosilación con predominancia de manosa, la ausencia de ácido siálico en estas moléculas y, por tanto, la posibilidad de inducción de respuesta inmune además de una vida media corta (Lam *et al.*, 2007; Luong *et al.*, 2007). En cultivos celulares de insecto con células de *Spodoptera frugiperda* (Sf21), la sialización de los oligosacáridos es muy escasa, de lo que se deduce una vida media corta para su utilización *in vivo* en vertebrados (Marchal *et al.*, 2001).

La obtención de FSH recombinante con bioactividad *in vivo* a partir de su expresión en CHO ha resultado un método eficaz para la utilización de esta hormona en la inducción del ciclo ovárico en humanos (Smitz *et al.*, 2016; Walsh y Jefferis, 2006), en bovinos (Carvalho *et al.*, 2014) y equinos (Meyers-

Brown *et al.*, 2011). La FSH producida en este sistema de expresión también ha manifestado su actividad *in vivo* en la inducción de la espermatogénesis en peces teleósteos como el lenguado de Senegal (*Solea senegalensis*) (Chauvigne *et al.*, 2018), anguila europea (*Anguilla anguilla*) (Penaranda *et al.*, 2018) y en lubina (Mazón *et al.*, 2014). Las células CHO han sido utilizadas tanto para la producción de FSH y LH como de otras glicoproteínas recombinantes con finalidad terapéutica por su capacidad de cultivo en suspensión a altas concentraciones en medio libre se suero, y por su eficacia en la realización de los procesos de modificación postraduccional propias de vertebrados (Costa *et al.*, 2014).

La producción de FSH recombinante bioactiva también se ha llevado a cabo mediante la expresión de esta hormona en forma de cadena única. En este caso, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se encuentran unidas entre sí de modo covalente. Esta unión puede realizarse mediante construcciones de ADNc en las que el extremo amino terminal de la subunidad  $\alpha$  (proteína madura) está unido directamente al carboxilo terminal de la subunidad  $\beta$  dando un monómero con la estructura NH<sub>2</sub>- $\beta$ - $\alpha$ -COOH ( $\beta$ - $\alpha$ ), o mediante la adición de una secuencia de unión (linker) entre ambas subunidades ( $\beta$ -linker- $\alpha$ ) (Sugahara *et al.*, 1996).

La secuencia aminoacídica de la subunidad  $\beta$  de la gonadotropina coriónica humana (HCG, secretada por tejido trofoblástico y placentario embrionarios) tiene un elevado porcentaje de identidad con la subunidad  $\beta$  de la LH hipofisaria humana (85%) en los primeros 114 aminoácidos. Sin embargo, la subunidad  $\beta$  de la HCG contiene una extensión de 31 aminoácidos en su extremo carboxilo terminal ausente en la subunidad  $\beta$  de la LH. Este péptido carboxilo terminal (CTP) contiene cuatro glicosilaciones unidas a residuos serina (O-glicosilaciones) que confieren a la HCG una vida media superior a la de la LH y otras hormonas glicoproteicas (García-Campayo *et al.*, 2002; Yoshimura y Hershman, 1995).

La utilización de la secuencia de los 28 aminoácidos del CTP como molécula de unión entre las subunidades  $\beta$  y  $\alpha$  de la FSH y su expresión en CHO proporciona un mayor rendimiento en la expresión de esta molécula y una vida media superior mientras su actividad biológica está conservada *in vitro* (Klein *et al.*, 2003; Sugahara *et al.*, 1996; Sugahara *et al.*, 1996) e *in vivo* (Klein *et al.*, 2002).

Actualmente, existe un preparado comercial de FSH de larga acción (ELONVA ®/MSD) con la estructura anteriormente descrita ( $\beta$ -CTP- $\alpha$ ) que se utiliza regularmente en terapia de reproducción asistida para la inducción del desarrollo folicular en mujeres (Ben-Menahem, 2018; Pouwer *et al.*, 2015).



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 2.1. INTRODUCCIÓN

La reproducción *ex situ* es una de las medidas reconocidas por la comunidad científica y conservacionista para la preservación de especies amenazadas y su reintroducción en el medio natural. Sin embargo, la reproducción en cautividad de estas especies fracasa con frecuencia debido a la ausencia de estímulos ambientales y al estrés, ambos factores asociados a la vida en cautividad. La presencia de estos factores impide el desarrollo de los ciclos reproductivos fisiológicos en condiciones naturales y, por tanto, la obtención de progenie a partir de individuos valiosos desde el punto de vista ecológico y de la diversidad genética de la especie.

La aplicación de métodos de inducción del ciclo reproductivo, tal como se practica en seres humanos o en diferentes especies de mamíferos podría resolver parte de los problemas que se dan en la reproducción *ex situ* de especies aviares amenazadas.

Por otra parte, la aportación de conocimiento a la fisiología reproductiva de las aves, y, concretamente, a los mecanismos hormonales que controlan estos procesos, sería relevante para la mejor comprensión de los ciclos reproductivos en la naturaleza y para la aplicación de dicho conocimiento a la producción industrial de aves y huevos para consumo humano.

## 2.2. HIPÓTESIS

La reproducción en aves está sometida a la presencia de determinados estímulos ambientales que, al actuar sobre individuos en estado de madurez y condiciones somáticas suficientes, desencadenan respuestas hormonales que, a su vez, inducen la maduración de gametos y la fecundación.

Las hormonas gonadotropas hipofisarias, FSH y LH, son efectores de este proceso y su administración ha sido eficaz en la inducción de ciclos reproductivos tanto en seres humanos como en diferentes especies animales.

En el caso de las aves, los intentos realizados para inducir su ciclo reproductivo se han visto dificultados por la ausencia de preparados hormonales puros y específicos, y los escasos intentos desarrollados han estado basados en la administración de extractos crudos de adenohipófisis de pollo o de gonadotropinas de mamíferos.

En la actualidad, las técnicas de ingeniería genética permiten la producción de gonadotropinas recombinantes específicas, y su uso en la inducción de ciclos reproductivos en humanos está ampliamente extendido. Además, la producción de gonadotropinas recombinantes de otras especies ha sido llevada a cabo.

Por tanto, dada la similitud en la estructura bioquímica entre las gonadotropinas de vertebrados, resulta verosímil la posibilidad de obtención de FSH recombinante específica de especies aviares.

Tras su obtención, la administración de esta hormona podría (sola o en combinación con otras hormonas) inducir el desarrollo folicular ovárico en aves y aportar conocimiento a la fisiología reproductiva en estas especies.

## 2.3. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo de investigación fueron los siguientes:

1. Producción de FSH recombinante de codorniz con actividad biológica *in vitro* e *in vivo*.
2. Evaluación de la actividad y especificidad de acción de FSH recombinante de codorniz *in vitro*.
3. Determinación de la actividad biológica de FSH recombinante de codorniz *in vivo*.
4. Inducción del ciclo ovárico en codorniz y paloma mediante administración de FSH recombinante de codorniz.
5. Obtención de progenie en una especie aviar mediante la inducción del ciclo ovárico con FSH recombinante, fecundación artificial e incubación de los huevos.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 3.1. MATERIALES

### 3.1.1. Animales

Los protocolos y el cuidado de los animales utilizados en nuestros trabajos de experimentación se realizaron según las especificaciones del Real Decreto 21/10/2005, sobre “*Protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos*”.

#### 3.1.1.1. Gallinas (*Gallus gallus domesticus*)

Se obtuvieron gallinas de raza ponedora en ciclo de puesta en granja industrial y se alojaron en jaulas individuales de 67 cm de frente, 70,5 cm de fondo y 50 cm de altura. Se proporcionó alimento y agua *ad libitum*, con fotoperiodo natural y temperatura ambiente (8-28°C).

#### 3.1.1.2. Codorniz común (*Coturnix coturnix*)

La elección de esta especie para los ensayos *in vivo* estuvo basada en su fácil mantenimiento en condiciones experimentales, en el conocimiento de la fisiología de su ciclo ovárico (Ramasamy *et al.*, 2014), y la experiencia en la inducción de la maduración ovárica en codorniz japonesa llevada cabo por otros grupos (Wakabayashi *et al.*, 1992; Bennett, 2002).

Se obtuvieron en granja industrial sesenta ejemplares de la especie *Coturnix coturnix* de ambos sexos y fueron alojados en cestas para codornices (Copele), de 100 cm de frente, 47 cm de fondo y 22 cm de altura (cuatro jaulas por cesta). Las cestas se dispusieron en batería (vertical). Cada jaula alojó a cuatro hembras y un macho, con disponibilidad de alimento y agua *ad libitum* con fotoperiodo natural y temperatura ambiente (8 - 28°C).

Los huevos puestos espontáneamente por estos ejemplares fueron incubados artificialmente en incubadora R-Com 20 (Rcom CMPNY, Canadá) a 37,7 °C con 50% de humedad relativa los primeros 14 días y 70 % los tres días siguientes. El volteo automático cada 4 horas se mantuvo hasta el día once de incubación. Las eclosiones se produjeron habitualmente el día 16 o 17 de incubación.

Tras la eclosión, los pollos fueron mantenidos en suelo con serrín, bombilla infrarroja de 100 W (Philips) como fuente de calor, y alimento y agua *ad libitum*. Cuatro semanas tras la eclosión, las hembras fueron instaladas en las jaulas definitivas (cuatro individuos hembra por jaula), con fotoperiodo de 8 horas de luz y 16 de oscuridad (8L:16D) a temperatura ambiente. En estas condiciones se mantuvieron durante la realización de los experimentos.

El peso medio de los individuos al inicio de los ensayos fue  $82 \pm 10,7$  g.

### **3.1.1.3. Palomas (*Columba livia*)**

Se obtuvieron ochenta individuos a partir de un distribuidor comercial. Las edades no pudieron ser determinadas para cada individuo, aunque, según información del distribuidor, la mayoría de individuos tenía edades inferiores a cuatro meses en el momento de la adquisición.



#### **Ilustración 10. Imagen del sistema de baterías para alojamiento de palomas**

Las palomas fueron alojadas en las mismas baterías que las codornices, pero distribuyendo un único individuo por jaula. Con la finalidad de mantener a los animales en reposo reproductivo para la realización de los ensayos, en las jaulas destinadas a su alojamiento se acopló un separador opaco que impidiera el contacto visual entre individuos, dado que este contacto es necesario para el desarrollo de ciclos ováricos espontáneos en esta especie (Barfield, 1971; Matthews, 1939). Tanto la alimentación como el agua fueron proporcionados *ad libitum*.

### **3.1.2. Hormonas comerciales**

La gonadotropina coriónica equina (eCG) (Folligon, Intervet) se adquirió en viales de 500 UI en polvo que fue disuelto en suero fisiológico en función de la dosis a administrar.

El benzoato de estradiol (E85015, Sigma), fue disuelto en disolución de etanol (10 %) y aceite de sésamo (90 %) (Sigma) a una concentración final de 0,5 mg/ml.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Obtención de anticuerpos anti- $\beta$ FSH, anti- $\beta$ LH y anti- $\alpha$ -sub de codorniz

Los trabajos de esta tesis incluyeron la obtención de una FSH recombinante de codorniz en un sistema de expresión de células de mamífero (CHO) y la purificación de LH a partir de adenohipófisis de pavo.

Por tanto, el desarrollo de anticuerpos específicos para FSH recombinante de codorniz y FSH y LH hipofisarias de pavo, fue considerado una herramienta imprescindible para la detección y seguimiento de estas hormonas en los procesos de laboratorio: expresión en el medio de cultivo o lisados celulares, purificación, concentración, diálisis, etc.

Con este objeto, se expresaron en sistema procariota (*E. coli*) las proteínas maduras (sin péptido señal) de las subunidades  $\alpha$  común a FSH y LH ( $\alpha$ -FSH/LH) de codorniz,  $\beta$ -FSH de codorniz, y  $\beta$ -LH de pollo, unidas las tres, en su extremo amino terminal, a una secuencia de polihistidina (6XHis) para su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC).

Una vez purificadas y acondicionadas, las proteínas se inyectaron en conejos para su inmunización con el objeto de obtener los anticuerpos correspondientes.

#### 3.2.1.1. Subclonación de las subunidades de las gonadotropinas de codorniz en vector de expresión procariota (pDEST<sup>TM</sup>17)

El ADNc de las tres proteínas fue sintetizado por la empresa GeneArt (Alemania). La síntesis se realizó mediante un sistema de optimización de

codones para expresión en células procariotas llevado a cabo por la propia empresa.

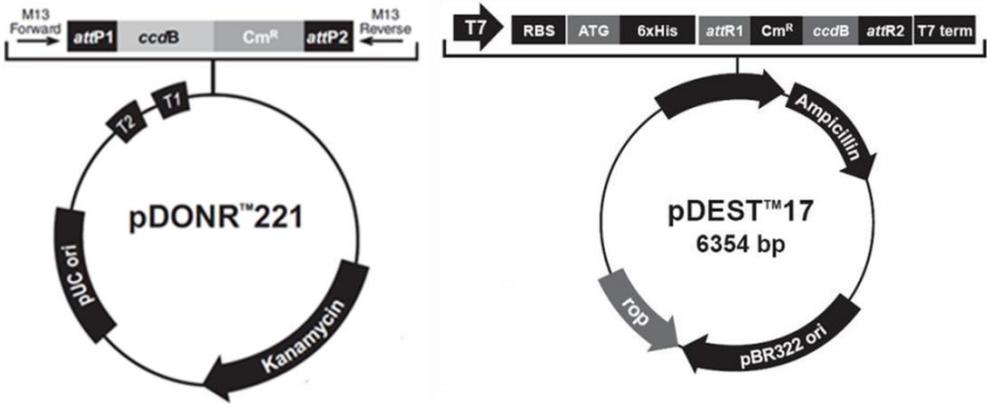
Los ADNc de partida fueron sintetizados en función de las secuencias aminoacídicas de las tres subunidades:

- $\beta$ -FSH: GenBank: BAC01164.1
- $\beta$ -LH: GenBank: GenBank: ADY03193.1
- $\alpha$ -FSH/LH: GenBank: AAB30866.1

Una vez sintetizadas, las secuencias de ADNc de las tres subunidades fueron subclonadas en el vector pDEST<sup>TM</sup>17 del sistema Gateway® (Invitrogen), que incorpora una secuencia de polihistidina (6XHis) unida a una secuencia de unión (linker) en el extremo amino terminal de la proteína a expresar.

En resumen, el sistema de subclonación Gateway® tiene el siguiente fundamento:

- El gen sintético es subclonado en el vector pDONRTM221 (vector “lanzadera”) mediante reacción de recombinación por clonasa.
- Una vez subclonado en pDONRTM221, el gen sintético puede ser transferido a otros vectores de expresión, “vectores de destino” (en nuestro caso, pDEST<sup>TM</sup>17) mediante la misma estrategia de recombinación por clonasa.
- Tras la subclonación en pDEST<sup>TM</sup>17, esta construcción es utilizada para transformación de células procariotas y expresión de la proteína unida a secuencia 6XHis.

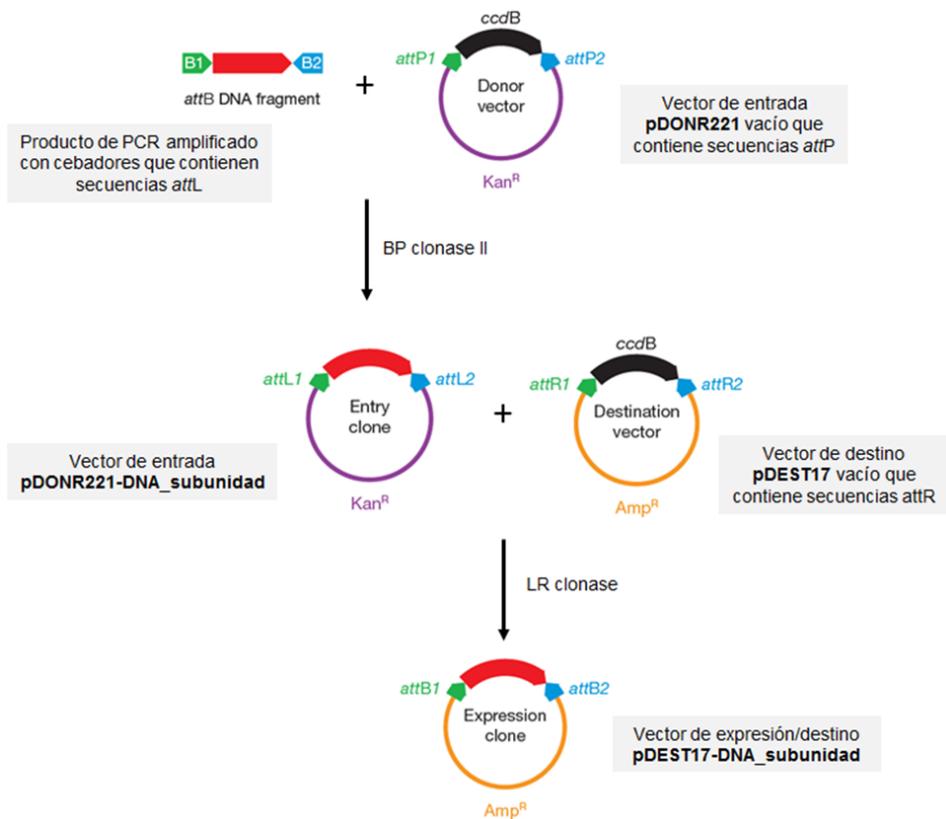


**Ilustración 11. Esquema de los vectores del sistema Gateway® (Invitrogen)**

El vector pDONRTM221 es portador de un gen letal (*ccdB*) flanqueado por las secuencias *attP1* y *attP2*. La inserción del ADNc de interés sustituirá el gen *ccdB* por el inserto permitiendo la supervivencia bacteriana y la selección de las construcciones buscadas. Para esta inserción, las secuencias *attP1* y *attP2* se recombinarán con las secuencias:

- *attB1*: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC-3'
- *attB2*: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'

generando las secuencias *attL1* y *attL2* que flanquearán el ADNc subclonado en pDONRTM221 sustituyendo así el gen *ccdB* por el inserto de interés.



**Ilustración 12. Esquema ilustrativo de la subclonación en pDEST<sup>TM</sup>17.**

El ADNc (inserto) es subclonado por recombinación (BPclonase II) en el vector de entrada pDONR<sup>TM</sup>21 (*donor vector*). Posteriormente, mediante recombinación por LR clonasa, el inserto es subclonado en pDEST<sup>TM</sup>17 (*expression clone*), que incorpora la secuencia 6XHis + secuencia de unión al extremo N-terminal del ADNc.

Para que se lleve a cabo esta recombinación, las secuencias *attB1* y *attB2* deberán ser incorporadas a la secuencia de ADNc mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por tanto, los oligonucleótidos para estas reacciones se diseñaron uniendo las secuencias *attB1* a los primeros 28 – 31 nucleótidos complementarios del ADNc (directo) o *attB2* a los 28 – 31 últimos incluyendo codón de parada (reverso). El producto resultante, B1-

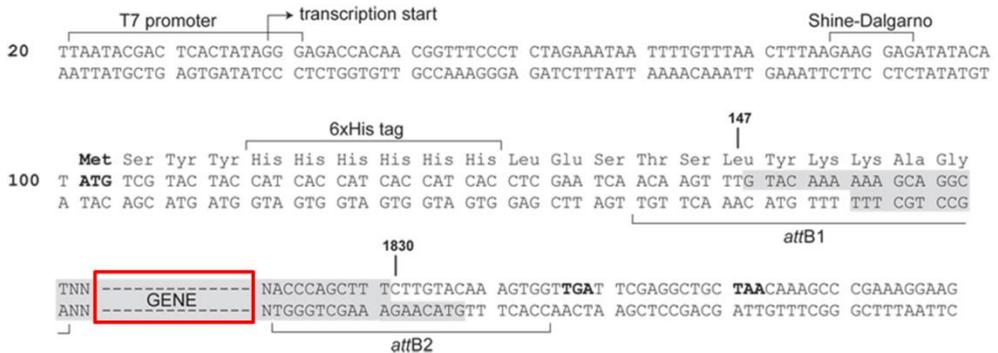
ADNc-B2, será recombinado en pDONR<sup>TM</sup>21. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma.

**Tabla 1. Tabla de oligonucleótidos utilizados para obtención de B1-ADNc-B2.**

En mayúsculas, secuencias *attB1* y *attB2*. En minúsculas, secuencias complementarias de ADNc (subunidades gonadotropinas). Resaltado en gris, codones de parada (stop).

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Vector de expresión
AttB1_β-FSH-5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TCtgcgagctgaccaacatcaccatcgccg	pDEST17
AttB2_β-FSH-3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTt tactggttggagccgttggtggagaaggag	
AttB1_β-LH-5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TCaaccctccgtggccgtggaccctcctctg	pDEST17
AttB2_β-LH-3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTt tattgccgccaagccgccaggtgctcca	
AttB1_α-5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TCtccctgacggcgagttcctgatgcagga	pDEST17
AttB2_α-3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTt taggacttggttagtagcaggtggagca	

Tras la recombinación en pDEST<sup>TM</sup>17, se generarán las secuencias *attB1* y *attB2* flanqueando el inserto.



### Ilustración 13. Secuencia nucleotídica y aminoacídica resultante tras recombinación en pDEST<sup>TM</sup>17.

Encuadrado en rojo: ADNc, precedido por 22 codones que incluyen la secuencia 6XHis. Regeneración de las secuencias *attB1* y *attB2*. NN = 5' TC 3'.

Las secuencias nucleotídicas de las subunidades con los codones optimizados fueron las siguientes (en subrayado, sitio de unión de los oligonucleótidos cebadores):

#### Subunidad $\alpha$ -FSH/LH:

TTCCCTGACGGCGAGTTCCTGATGCAGGGATGTCCAGAGTGCAAACTCGGAGAAAA  
TAGATTTTTTCTCTAAACCTGGCGCCCCTATCTACCAGTGCAACCGGATGTTGTTTTT  
CTAGGGCTTACCCTACCCCTATGCGGTCCAAAAAACCATGCTCGTCCCTAAGAAC  
ATCACCTCCGAAGCTACATGTTGTGTGGCCAAGGCCTTACCAAGATCACCCTGAA  
GGACAACGTGAAGATCGAGAACCACCCGACTGTCACTGCTCCACCTGCTACTACC  
ACAAGTCC

#### Subunidad $\beta$ -FSH:

TGCGAGCTGACCAACATCACCATCGCCGTGGAGCGGGAGGAGTGCGAGATGTGCAT  
CACCGTGAACGCCACCTGGTGCTCCGGATACTGCTTTACCCGGGACCCTGTGTACA  
AGTACCCTCCTGTGTCTCCGTGCAGCAGATCTGCACCTTCAAGGAGGTGGTCTAC  
GAGACCGTGAAGATCCCTGGCTGCGGCGACCACCCTGAGTCCTTCTACTCCTACCC  
TGTGGCCACCGGCTGCCACTGCGAGACCTGCGACACCGACTCCACCGACTGCACCG  
TGCGGGGCCTGGGCCCTTCTACTGCTCCTTCTCCACAACGGCTCCAACCAG

**Subunidad  $\beta$ -LH:**

AACCCTCCCGTGGCCGTGGACCCTCCTCTGGCTGTGGTCCGACCACCTATGGGACT  
CGGAGGAGGAGGACGGCCTCCTTGCCGGCCTATCAACGTGACCGTGGCTGTGGAGA  
AGGACGGCTGCCCTCAGTGCATGGCCGTGACCACCACCGCCTGCGGCGGCTACTGC  
CGGACCCGGGAGCCTGTGTACCGGTCCCCTCTGGGCCCTCCACCTCAGTCCGCCTG  
CACCTACGGCGCCCTGAGATACGAGAGATGGGCCCTGTGGGGCTGCCCTATCGGCT  
CCGACCCAAGGGTCTCTGCTGCCAGTCGCTCTGTCTCCTGCAGATGCGCCCGGTGCCCT  
ATGGCCACCTCCGACTGCACCGTGCAGGGCCTGGGACCCGCTTTCTGTGGAGCACC  
TGGCGGCTTTGGCGGCGAA

Por tanto, las secuencias aminoacídicas resultantes de la expresión (traducción) una vez subclonadas en pDEST<sup>TM</sup>17 serían las siguientes:

**Subunidad 6XHis\_ $\alpha$ -FSH/LH:**

MSYHHHHHHHLESTSLYLLAGFFPDGEFLMQCPECKLGENRFFSKPGAPIYQCTG  
CCFSRAYPTPMRSKKTMLVPKNITSEATCCVAKAFTKITLKDENVKIENHTDCHCST  
CYYHKS

**Subunidad 6XHis\_ $\beta$ -FSH:**

MSYHHHHHHHLESTSLYLLAGFCELTNITIAVEREECEMCITVNATWCSGYCFTRD  
PVYKYPVSSVQQICTFKEVVYETVKIPGCGDHPESFYSPVATGCHCETCDTDTST  
DCTVRGLGPSYCSFSHNGSNQ

**Subunidad 6XHis\_ $\beta$ -LH:**

MSYHHHHHHHLESTSLYLLAGFNPPVAVDPPPLAVVGPMPGLGGGRPPCRPINVTV  
AVEKDGPQCMAVTTTACGGYCRTREPVYRSPLGPPPQSACTYGALRYERWALWGC  
PIGSDPRVLLPVALSCRCARCPMATSDCTVQGLGPAFCGAPGGFGGE

**3.2.1.1.1. Reacción de PCR para subclonación en pDONR<sup>TM</sup>221**

---

La reacción de PCR para generar el inserto a subclonar en pDONR<sup>TM</sup>221 se llevó a cabo en termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) utilizando los siguientes materiales: Tubos de PCR (Axygen), Kit Platinum®

Pfx Polimerase 2,5U/ $\mu$ L (Invitrogen), oligonucleótidos (Sigma) y dNTPs (Fermentas).

**Tabla 2. Mezcla de PCR para generación de inserto a subclonar en pDONR221**

Componente	Volumen	Concentración final
10X Buffer Pfx	5 $\mu$ l	1x
10 mM dNTPs	1,5 $\mu$ l	0,3 mM
50 mM MgSO <sub>4</sub>	1 $\mu$ l	1 mM
Oligo directo [10 mM]	0,75 $\mu$ l	0,3 $\mu$ M
Oligo reverso [10 mM]	0,75 $\mu$ l	0,3 $\mu$ M
DNA molde	1 $\mu$ l	~5 ng/ $\mu$ l
Pfx DNA Polimerase	0,5 $\mu$ l	1,2 U
H <sub>2</sub> O milli Q	39,5 $\mu$ l	
Volumen final:	50 $\mu$ L	

**Tabla 3. Programación termociclador para PCR para generación de inserto a subclonar en pDONR221**

Fase	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización	94 ° C	2 min	1
Desnaturalización	94 ° C	15 seg	25
Anillamiento	55 ° C	30 seg	
Elongación	68 ° C	45 seg	1
Elongación	68 ° C	7'	
	4 ° C	$\infty$	

### 3.2.1.1.2. Purificación del producto de PCR para su subclonación en pDONR<sup>TM</sup>221

---

La purificación del producto de PCR generado en el apartado anterior se llevó a cabo utilizando el kit de purificación de ADN Kit QIAquick® PCR Purification (50) (Qiagen). Este kit permite la purificación de fragmentos de ADN de tamaño comprendido entre 100bp hasta 10Kb.

El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Adición de cinco volúmenes del tampón PB1 por cada volumen de PCR. Para 50 µl de producto de PCR se añadieron 250 µl del tampón. El color de la mezcla se torna amarillo. Si el color se torna violeta o naranja deben añadirse 5 µl de Acetato de Sodio 3M a pH 5.0 y mezclar bien hasta que adquiera color amarillo.
2. Vertido de la mezcla ADN-tampón PB1 en una columna suministrada con el kit y colocada previamente dentro en un tubo colector. Centrifugación a 10000 x g durante 60 segundos.
3. Eliminación del líquido que queda en el tubo colector (inferior) y adición a la columna de 375 µl del tampón PE. Centrifugación a 10000 x g durante 60 seg.
4. Eliminación del líquido del tubo colector y centrifugación adicional para eliminación de los restos de etanol (60 seg a 10000 x g).
5. Transferencia de la columna a un tubo Eppendorf de 1,5 ml limpio y elución del ADN purificado añadiendo 50 µl del tampón EB directamente sobre la membrana de la columna.
6. Esperar un minuto hasta hidratación de la membrana y centrifugación a 10000 x g durante 60 segundos.

### 3.2.1.1.3. Reacción de recombinación para subclonación en pDONR<sup>TM</sup>221

---

La subclonación de los insertos generados por PCR (Subunidades 6XHis<sub>α</sub>-FSH/LH, 6XHis<sub>β</sub>-FSH y 6XHis<sub>β</sub>-LH) se llevó a cabo mediante

reacción de recombinación de los productos de PCR obtenidos previamente con el plásmido pDONR221 purificado (método de purificación descrito en posteriores apartados) utilizando el Kit BP Clonase (Invitrogen).

El procedimiento utilizado fue el siguiente:

1. Adición en un mismo tubo Eppendorf de 1,5 ml del producto de PCR purificado (15 a 150 ng en un volumen máximo de 7  $\mu$ l) y el ADN del vector pDONR<sup>TM</sup>221 a una concentración de 150 ng/ $\mu$ l (1 $\mu$ l), y adición de 8  $\mu$ l de tampón Tris-EDTA pH 8.0.
2. Depósito de la enzima BP Clonase en hielo durante 2' y adición posterior de 2  $\mu$ l de la enzima BP al tubo Eppendorf que contiene la mezcla de ADNs. Incubación de la reacción a 25°C durante 1 hora.
3. Tras la hora de incubación, se añadió 1  $\mu$ l de Proteasa K y se agitó ligeramente con Vortex. Incubación a 37°C durante 10 minutos.
4. Transformación de bacterias competentes.

#### 3.2.1.1.4. Transformación de bacterias con pDONR<sup>TM</sup>221\_Subunidad

La transformación de bacterias competentes se llevó a cabo para la posterior selección de colonias portadoras de la construcción pDONR<sup>TM</sup>221\_Subunidad correspondiente. Las bacterias utilizadas para esta transformación fueron las TOP10 (Invitrogen), y el procedimiento seguido, el siguiente:

1. Adición de 2  $\mu$ L del ADN a transformar en un tubo con 50  $\mu$ l de bacterias TOP10 sin pipetear para mezclar. Depositar el tubo durante 30 minutos en hielo.
2. Posteriormente, transferencia del tubo a un baño de agua a 42°C para choque térmico durante 30 segundos. Colocación nuevamente en hielo.
3. Adición de 250  $\mu$ L de medio LB (Pronadisa) y agitación del tubo en incubador con agitador orbital (Minitrón, Infors) durante 1 hora a 37°C y 225 rpm.

4. Siembra del contenido del tubo en placas Petri con LB y el antibiótico de selección. Sembrar dos placas por transformación, una con 20 y otra con 100  $\mu$ l de la transformación.
5. El resto de la transformación se mantuvo a 4°C como reserva para caso de necesidad de repetición de la siembra.
6. Colocación de las placas Petri en estufa a 37°C durante toda la noche. Tras 24 h, detección de colonias y posterior análisis por PCR para comprobación de la presencia del vector con su inserto.

#### 3.2.1.1.5. Selección colonias con inserto en pDONR<sup>TM</sup>221\_Subunidad

Cada colonia se suspendió en 30  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O milli Q estéril para la preparación del ADN molde. La reacción de PCR se realizó del modo descrito previamente. Los oligonucleótidos utilizados fueron: M13 (directo, que hibrida con secuencia del vector) y, como reverso, los oligonucleótidos específicos para cada subunidad. En este caso, la polimerasa utilizada fue Taq polimerasa (VWR collection).

**Tabla 4. Mezcla de PCR para selección de colonias portadoras de pDONR\_221\_Subunidad.**

Componente	Volumen	Concentración final
10X Buffer Taq	1 $\mu$ l	1X
10 mM dNTPs	0,1 $\mu$ l	0,1 mM
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,6 $\mu$ l	1 mM
Oligo directo [10 mM]	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
Oligo reverso [10 mM]	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
ADN molde	1 $\mu$ l	~50-100 ng
Taq DNA Polimerasa	0,2 $\mu$ l	0,5 U
H <sub>2</sub> O milli Q	6,1 $\mu$ l	
Volumen final:	10 $\mu$ l	

Las colonias identificadas como positivas por PCR para pDONR\_Subunidad se crecieron posteriormente y su ADN plasmídico fue purificado para subclonación en pDEST17 tal como se describe en siguientes apartados.

#### 3.2.1.1.6. Reacción de recombinación para subclonación en pDEST17

La reacción de recombinación para subclonación del inserto de pDONR221\_Subunidad en pDEST17 se llevó a cabo con el Kit LR Clonase (Invitrogen) mediante el siguiente procedimiento:

1. Adición en un tubo Eppendorf de 1,5 ml: 50 a 150 ng de pDONR221\_Subunidad en un volumen máximo de 7  $\mu$ l, y 1  $\mu$ l del vector de destino pDEST17 a una concentración de 150 ng/ $\mu$ l. Adición de 8  $\mu$ l de tampón Tris-EDTA pH 8.0.
2. Colocación de la enzima LR Clonase en hielo durante 2 minutos y adición posterior de 2  $\mu$ l de LR clonasa al tubo Eppendorf con la mezcla de ADNs plasmídicos. Incubación a 25°C durante 1 hora.
3. Tras 1 hora de incubación, adición de 1  $\mu$ l de Proteasa K y agitación ligera mediante vórtex. Incubación a 37°C durante 10 minutos.
4. Realización de transformación de bacterias competentes BL21 (DE3) siguiendo idénticas condiciones a las utilizadas anteriormente para la transformación de bacterias competentes TOP10.

#### **3.2.1.2. Producción y purificación del ADN plasmídico**

Para la obtención de ADN plasmídico purificado de los vectores de expresión utilizados tanto en subclonación como en expresión de proteínas en sistemas procariotas y eucariotas, se utilizó la metodología siguiente.

### **3.2.1.2.1.1 Preparación del cultivo de *E. coli***

Tras la transformación de bacterias competentes con el plásmido de interés según lo descrito anteriormente, se procedió del siguiente modo:

- Toma de una colonia única de una placa de Petri de agar- LB (Pronadisa) fresca (con kanamicina o ampicilina, en función del gen de resistencia del vector), aislada a partir de la estría generada por las bacterias transformadas con el vector de interés, e inoculación de la misma en 10 ml de medio LB con el mismo antibiótico de selección.
- Incubación durante la noche (~16 horas) a 37°C en incubadora de agitación orbital a 225 rpm.

### **3.2.1.2.1.2 Lisado celular y clarificación**

- Colección de los 10 ml de cultivo bacteriano en tubo de ultracentrifugación y centrifugación durante 5 minutos a 10.000 x g. Vertido del sobrenadante del cultivo y eliminación del exceso de medio procurando dejar el sedimento celular lo más seco posible.
- Adición de 250 µl de la Solución de Resuspensión Celular provista por el kit y resuspensión completa del sedimento celular mediante agitación con vórtex o pipeteo.
- Transferencia de las bacterias resuspendidas a un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml, adición de 250 µl de la Solución de Lisis Celular provista por el kit y mezcla mediante inversión del tubo 4 veces (no agitar en vórtex). Incubación durante 3 - 5 minutos.
- Adición de 10 µl de la Solución de Proteasa Alcalina y mezcla invirtiendo el tubo 4 veces. Incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente. La proteasa alcalina inactiva las endonucleasas y otras proteínas liberadas durante la lisis de las células bacterianas que afectan adversamente la calidad del ADN.

- Adición de 350 µl de Solución de Neutralización y mezcla inmediata invirtiendo el tubo 4 veces. Centrifugación del lisado bacteriano a  $14,000 \times g$  en microcentrífuga durante 10 minutos a temperatura ambiente.

### 3.2.1.2.1.3 *Aislamiento y purificación del ADN plasmídico*

En todos los casos, el DNA plasmídico del vector de expresión se purificó empleando los kits de aislamiento de ADN Wizard™ Miniprep (Promega), partiendo de 10 ml de cultivo bacteriano y siguiendo el siguiente protocolo:

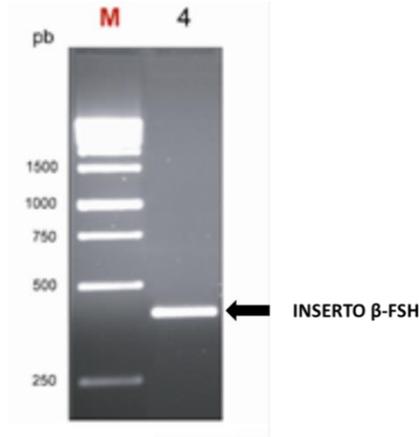
- Preparación de las unidades de purificación de ADN plasmídico provistas con el kit insertando una columna *spin* en un tubo de recolección de 2 ml para cada muestra.
- Transferencia por decantado del lisado ( $\approx 850 \mu\text{l}$ ) a la columna de *spin* preparada. Evitar transferir cualquiera de los precipitados de color blanco con el sobrenadante.
- Centrifugación del sobrenadante a velocidad máxima en una microcentrífuga durante 1 minuto a temperatura ambiente. Retirar la columna del tubo y desechar el líquido del tubo de recogida (inferior). Insertar de nuevo la columna *spin* en el tubo de recogida.
- Adición de 750 µl de solución de lavado de columna, previamente diluida con etanol (95%), a la columna *spin*. Centrifugar a máxima velocidad en una microcentrífuga durante 1 minuto a temperatura ambiente. Retirar la columna y desechar el líquido del tubo inferior. Volver a insertar la columna en el tubo de recolección.
- Repetición del procedimiento de lavado utilizando 250 µl de solución de lavado de columna. Centrifugación a máxima velocidad en una microcentrífuga durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- Transferencia de la columna a un nuevo tubo estéril de microcentrífuga de 1.5 ml y elución del ADN plasmídico agregando 100 µl de agua libre de nucleasas a la columna *spin*.

Centrifugación a máxima velocidad durante 1 minuto a temperatura ambiente en microcentrífuga.

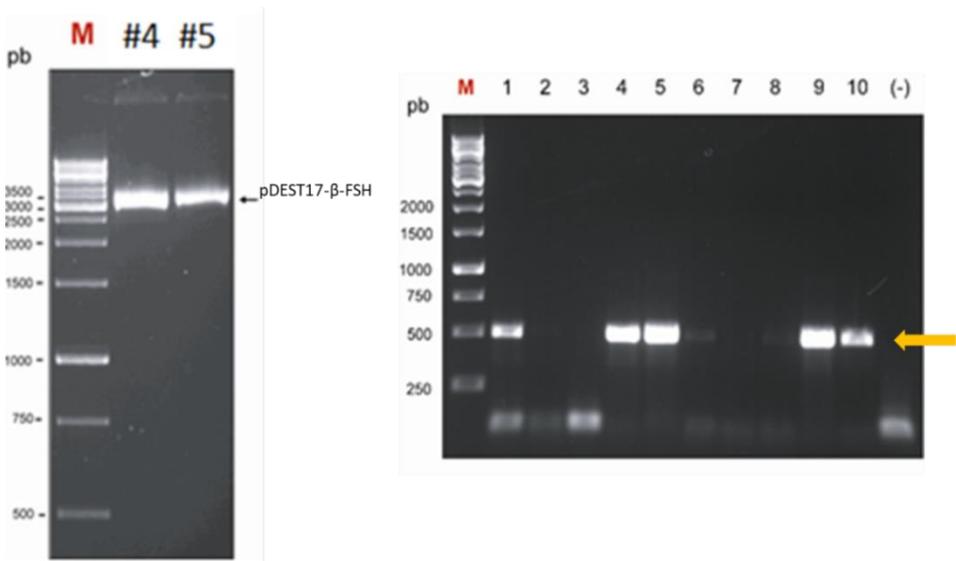
- Después de la elución del ADN, conservación del tubo de microcentrífuga de 1.5 ml que contiene el ADN plasmídico purificado.
- El ADN, estable en agua sin la adición de un tampón, se cuantificó por espectrofotometría (Nanodrop, Isogen) y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **3.2.1.3. Electroforesis de ADN en Geles de Agarosa**

Para la separación y análisis electroforético de las muestras de ADN se prepararon geles de agarosa (Sigma) al 1 y 1,5% en tampón TAE 1X (40 mM de TRIZMA® BASE, (Sigma); 40 mM ácido acético glacial, (Panreac); 1 mM EDTA (Sigma). Posteriormente se añadió tampón TAE 1X hasta cubrir el gel para el desarrollo de la electroforesis y se cargaron las muestras en los pocillos. Para la preparación de las muestras se mezclaron 5 - 8  $\mu\text{l}$  de ADN (plasmídico o muestras de ADN digerido) y 1  $\mu\text{l}$  de tampón de carga para DNA 10X (50% glicerol, Merck; 25 mM EDTA, Sigma; 0,05% azul de bromofenol (Sigma). Una vez cargadas las muestras, el gel se resolvió a 70-80 voltios durante 1,5 horas y se tiñó con una solución de bromuro de etidio 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Sigma). La visualización de bandas electroforéticas se realizó en el transiluminador de luz ultravioleta (UVIDOC, modelo DOC-008-XD), tomando las fotografías con la cámara incorporada. Para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN de las muestras se cargó en los carriles laterales de cada gel 5  $\mu\text{l}$  de marcador de peso molecular para DNA (sm0311 Generuler™ 1kb DNA ladder; Invitrogen) preparado a una concentración de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (100  $\mu\text{l}$  1 Kb DNA ladder stock a 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$  tampón de carga para DNA 10X y 800  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas).



**Ilustración 14. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR  $\beta$ -FSH**



**Ilustración 15. Electroforesis en gel de agarosa del vector pDEST17 e inserto 6XHis- $\beta$ -LH**

Imagen izquierda: Análisis por electroforesis en gel de agarosa (1%) del ADN plasmídico obtenido de los clones positivos de pDEST17- $\beta$ -FSH #4 y #5 cuyo inserto fue la subunidad 6XHis- $\beta$ -FSH. Estos ADNs se utilizaron para su posterior secuenciación. Imagen derecha: Flecha: Inserto  $\beta$ -LH tras digestión de la construcción pDEST17- $\beta$ -LH. Se obtuvieron imágenes semejantes para las subunidades 6XHis- $\beta$ -FSH y 6XHis- $\alpha$ -FSH/LH (no mostrados).

#### **3.2.1.4. Secuenciación de ADNc subclonados y confirmación de identidad**

Tras la obtención de los ADNs plasmídicos purificados, se enviaron muestras de los mismos al Servicio de Secuenciación del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) para su secuenciación. En este procedimiento se utilizaron oligonucleótidos cebadores que hibridan en la región del promotor T7 (propiedad del servicio de secuenciación).

Tras la recepción de los resultados de la secuenciación, se realizó la comprobación de la integridad de las secuencias clonadas mediante alineamiento de la secuencia problema versus la secuencia de referencia, haciendo uso de la herramienta bioinformática Web Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) del European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI). Se verificó en todos los casos la ausencia de mutaciones, inserciones, deleciones o codones de parada que pudieran alterar tanto el marco abierto de lectura (ORF) como la fase de lectura.

Posteriormente, mediante la herramienta bioinformática ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>) se procedió a la traducción *in silico* de las secuencias nucleotídicas y se comprobó, mediante alineamiento (<https://www.uniprot.org/align/>) la total identidad de las secuencias aminoacídicas codificadas por los ADNc subclonados con las secuencias esperadas. Las identidades resultaron del 100% para los ADNc de las tres subunidades cuya expresión se practicó posteriormente.

#### **3.2.1.5. Expresión de las proteínas en *E. coli***

Para la producción de las subunidades recombinantes en cantidad suficiente para la posterior inmunización de conejos se procedió del siguiente modo.

Se aislaron colonias individuales de células BL21 (DE3) de *E. coli*, transformadas previamente con los vectores destino pDEST17 portadores de las secuencias de las proteínas/subunidades de interés y del gen de resistencia a ampicilina, y se inocularon en 50 ml de medio de cultivo LB (Bactotripton 10 gr, Extracto de Levadura 5 gr, NaCl 10 gr, H<sub>2</sub>O desionizada hasta 1 litro; Pronadisa), suplementado con 100 µg/ml de ampicilina (Sigma). Estos cultivos de iniciación se crecieron toda la noche a 37°C con agitación orbital a 225 rpm. A partir de estos cultivos de iniciación se realizaron cultivos de 1l (dilución 1:100) en medio LB con 100 µg/ml del antibiótico, y se crecieron a 37°C con agitación (225 rpm) hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial (DO<sub>600 nm</sub> 0.6-0.8), momento en el que se añadió el agente inductor isopropil 1-β-D-galactopiranosido (IPTG; Sigma) a una concentración final 0.4 mM. Tras 3 horas de inducción con IPTG, las células se centrifugaron a 6000 rpm y el pellet de bacterias se resuspendió en 50 ml de una solución compuesta con 10 mM Tris, 150 mM NaCl y 0.1 mM EDTA a pH 7.5 (Merck) con inhibidores de proteasas (Complete, Roche). Posteriormente se añadieron 5.5 ml de 10% laurilsarcosinato sódico (Sigma) para lisar las células, se incubó la solución durante 30 minutos en hielo, se añadieron 6,1 ml de 10% Triton X-100 (Sigma) y, por último, se aplicaron 3 pulsos de sonicación de 1 min de duración cada uno a una amplitud del 10% (Sonicador Sonifier 150; Branson).

Las muestras lisadas se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C para separar la fracción soluble (SB: sobrenadante) de la insoluble (PL: cuerpos de inclusión), conservándose en todos los casos una alícuota de la muestra lisada preliminar (ET: extracto total) para su análisis. Todas estas muestras fueron analizadas mediante electroforesis para la valoración de la presencia de las proteínas de interés y otras proteínas contaminantes.

### **3.2.1.6. Purificación de las proteínas recombinantes fusionadas a 6xHis**

La purificación de las proteínas (fracción soluble) recombinantes fusionadas a la secuencia de polihistidinas (6xHis) se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) en columnas HisTrap™ FF Crude (GE Healthcare) de 5 ml acopladas a un sistema automatizado de purificación ÄKTA Prime (GE Healthcare). Los parámetros programados para la purificación fueron: lavado de la columna con 25 ml de agua y tampón de equilibrado a un flujo de 5 ml/min (5 volúmenes de columna, 5CV), equilibrado de la columna con 15 ml de tampón de elución (3CV) a flujo de 5 ml/min, inyección de la muestra a un flujo de 5 ml/min y lavado de la columna con 50 ml de tampón de equilibrado (10CV). La elución de las proteínas unidas a la columna se realizó con un gradiente de imidazol desde 20 mM hasta 500 mM. Las fracciones de proteína purificada fueron recogidas y mezcladas para su posterior diálisis frente a PBS. Este proceso se realizó en membranas de diálisis (12-14000 MWCO; Iberlabo) durante 18 h a 4° C en agitación.

Las preparaciones resultantes fueron sometidas a análisis electroforético y a cuantificación de la concentración de proteína para estimar los rendimientos en la expresión de cada subunidad.

#### **3.2.1.6.1. Cuantificación de las subunidades recombinantes**

---

El cálculo de la concentración final de proteína soluble purificada y dializada de cada subunidad se realizó mediante el Método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el kit comercial Quick Start Bradford Protein Assay kit 2 (Bio-Rad). Este método se basa en el cambio de color que experimenta el reactivo de Bradford cuando se une a la proteína de interés.

El cambio de color es directamente proporcional a la cantidad de proteína contenida en la muestra en estudio.

En el ensayo de cuantificación, se construyó una curva patrón de concentraciones conocidas mediante estándares de seroalbúmina bovina (BSA; Quick Start Bovine Serum Albumin Standard Set, Bio-Rad) a diferentes concentraciones (0.1, 0.125, 0.25, 0.5 y 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y se interpolaron en ella los valores obtenidos para las muestras de proteína recombinante en estudio. Todas las diluciones se realizaron en tubos Eppendorf de 1.5ml de capacidad, y las lecturas de las muestras se realizaron en cubetas de espectrofotometría (Cubetas semimicro PMMA 1,5 ml, BRAND) en espectrofotómetro GeneQuant 1300 (GE Healthcare) a 595 nm.

**Tabla 5. Rendimientos en proteínas recombinantes por litro de cultivo bacteriano**

Proteína recombinante	Concentracion	Volumen	Cantidad total
Subunidad 6XHis- $\beta$ -FSH	0.40 mg/mL	8.0 mL	3.20 mg
Subunidad 6XHis- $\beta$ -LH	0.25 mg/mL	7.5 mL	1.88 mg
Subunidad 6XHis- $\alpha$ -FSH/LH	0.10 mg/mL	11.0 mL	1.10 mg

### 3.2.1.7. Análisis electroforético de proteínas en geles SDS-PAGE

La electroforesis de las proteínas purificadas se realizó en geles de sodio dodecil sulfato (SDS) y poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

Una vez cuantificadas las proteínas por el método de Bradford, se evaluó su pureza e integridad mediante electroforesis vertical en geles de SDS-PAGE resueltos en tampón Tris/Glicina. Las muestras se colocaron en los pocillos del gel concentrador o de apilamiento polimerizado sobre el gel de

resolución. La concentración de poliacrilamida para el gel separador o de resolución fue del 10% y del 5% para el gel concentrador.

**Tabla 6. Composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE.**

<b>GEL DE APILAMIENTO (5%)</b>	
Componente	Volumen
H <sub>2</sub> O milliQ	2,06 ml
Acrilamida/bisacrilamida 40% (29/1) (Bio-Rad)	500 µl
Tris-HCl 1,0 M pH 6,8	380 µl
Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10% (Sigma)	30 µl
Persulfato de amonio 100 mg/ml (APS) 10% (Sigma)	30 µl
TEMED (N N N' N' Tetrametil-etilen-diamino; Sigma)	3 µl
Volumen final	3.0 ml
<b>GEL DE RESOLUCIÓN (10%)</b>	
Componente	Volumen
H <sub>2</sub> O milliQ	3,26 ml
Acrilamida/bisacrilamida 40% (29/1) (Bio-Rad)	2,66 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,92 ml
Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10% (Sigma)	80 µl
Persulfato de amonio 100 mg/ml (APS) 10% (Sigma)	77 µl
TEMED (N N N' N' Tetrametil-etilen-diamino; Sigma)	3 µl
Volumen final	8,0 ml

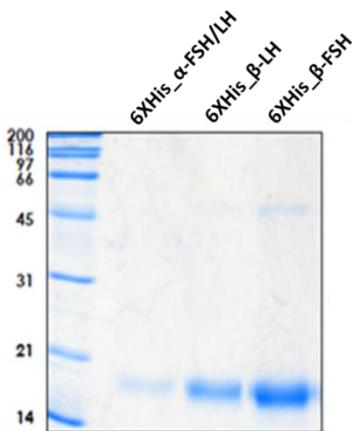
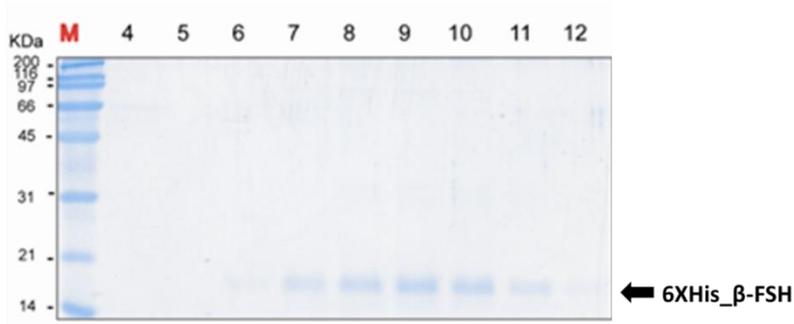
Las muestras de proteínas a evaluar se desnaturalizaron previamente por calentamiento a 100°C en presencia de SDS y un agente reductor ( $\beta$ -mercaptoetanol, Sigma). Se cargaron 16 µl de muestra por pocillo (8 µl de proteína purificada + 8 µl de tampón de carga 2X).

La composición del tampón de carga (5X) fue la siguiente:

- Tris-HCl 0,225 M pH 6.8
- Glicerol 50%
- SDS 5%
- azul de bromofenol 0,05%
- $\beta$ -mercaptoetanol 15%

Las muestras en tampón de carga se desnaturalizaron por calentamiento a 100°C durante 5 minutos en bloque térmico (Standard Heatblock; VWR Line) y se cargaron individualmente en los pocillos del gel concentrador. Una vez cargadas todas las muestras en el gel se sometieron a campo eléctrico vertical a 120 voltios (Fuente de Alimentación Fuente PowerPac Basic; BioRad) en tampón Tris-Glicina 1X (25 mM Tris-HCl, 250 mM glicina y 0,1% SDS). En los carriles laterales se cargaron marcadores de peso molecular pre-teñidos (Pre Stained SDS-PAGE Standards-Low Range, BioRad) para estimación del peso molecular de las proteínas separadas.

Por último, para visualizar las proteínas resueltas en el gel, los geles se tiñeron durante 10-15 minutos en una solución de Azul de Coomassie (45% metanol; 10% ácido acético glacial; 45% H<sub>2</sub>O milliQ; 0,25% Azul Brillante de Coomassie R-250, Sigma) y se destiñeron luego con una solución compuesta por 40% metanol; 10% ácido acético glacial y 50% H<sub>2</sub>O milliQ.



**Ilustración 16. Tinción con Azul de Coomassie de geles de electroforesis. Subunidades gonadotropinas.**

Imagen superior: Fracciones de purificación por IMAC de 6XHis<sub>β</sub>-FSH. Imagen inferior: Las tres subunidades tras proceso completo de purificación.

### 3.2.1.8. Verificación de la identidad de las proteínas recombinantes

Las bandas de proteína recombinante purificada (5 μg/pocillo) a partir del gel SDS-PAGE preparado en el punto anterior se cortaron con bisturí y se enviaron al servicio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Mediante espectrometría de masas MALDI TOF-TOF (Autoflex III. Bruker-Daltonics) se determinó la huella peptídica de cada preparación

analizada. Las secuencias resultantes verificaron que la identidad de las proteínas generadas era la esperada.

### 3.2.1.9. Generación de anticuerpos policlonales en conejo

Para la obtención de los antisueros policlonales de conejo (*Oryctolagus cuniculus*, raza New Zealand White) se siguieron protocolos estándar, inmunizando en cada caso dos hembras de entre 1,8 y 2,0 kg con cada uno de los antígenos (proteínas recombinantes) generados.

Los trabajos de inmunización y obtención de sueros inmunes fueron llevados a cabo por la empresa Vivotecnia S.L. (Madrid).

**Tabla 7. Protocolo de inmunización para la obtención de anticuerpos policlonales frente a subunidades de gonadotropinas.**

ACF: adyuvante completo de Freund. AIF: adyuvante incompleto de Freund.

Día	Etapas/Actividad del Protocolo	Muestra Obtenida
-1	Obtención del suero pre-inmune	3-5 ml de suero
0	Primaje (250 µg antígeno en ACF; V= 1.0ml)	---
3ª Semana	1ª dosis de recuerdo (125 µg antígeno en AIF; V= 1.0 ml)	---
6ª Semana	2ª dosis de recuerdo (125 µg antígeno en AIF; V= 1.0 ml)	---
9ª Semana	3ª dosis de recuerdo (125 µg antígeno en AIF; V= 1.0 ml)	---
10ª Semana	Obtención de suero para titulación	1-2 ml de suero
11ª Semana	Sangría final	50-70 ml de suero

El proceso completo comprendió un periodo de aproximadamente once semanas. Los antisueros finales obtenidos fueron titulados por ELISA indirecto, tapizando las placas microtiter (Nunc) con 0.5 µg de antígeno por pocillo, y haciendo diluciones seriadas del suero, comprobándose en todos

los casos la correcta respuesta inmune de los animales, con títulos siempre superiores a 1/32.000.

Por último, se purificaron 5 ml de cada antisuero policlonal mediante columnas de Proteína A (GE Healthcare). Las fracciones de anticuerpo purificado fueron agrupadas, dializadas frente a tampón fosfato salino (PBS), resueltas en geles SDS/PAGE y cuantificadas por el Método de Bradford.

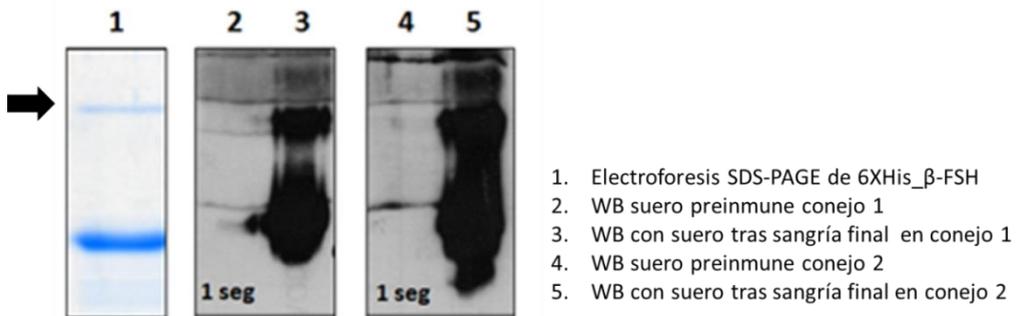
### **3.2.1.10. Inmunodetección**

Las proteínas separadas electroforéticamente en geles SDS-PAGE fueron transferidas posteriormente a membranas de nitrocelulosa (Nitrocellulose Hybond C extra 0.45; GE Healthcare) utilizando el equipo Mini Trans Blot (Bio-Rad) sobre agitador magnético (IKAMAG®; Janke & Kunkel Ika®-Labortechnik) con el objetivo de homogenizar el tampón de transferencia y evitar el calentamiento localizado, permitiendo así una transferencia eficiente. Las membranas se hidrataron previamente en el tampón de transferencia. El conjunto se preparó colocando dos piezas de papel Whatman® 3MM, el gel de acrilamida, la membrana hidratada y otras dos piezas de papel Whatman, eliminando las burbujas.

Las transferencias se llevaron a cabo durante 30-45 minutos a 100 voltios, en tampón de transferencia (25 mM Tris-Base, Sigma; 150 mM glicina, Merck; 20% v/v metanol, Merck; pH 8,3, con refrigeración a 4°C y agitación.

Las membranas de nitrocelulosa resultantes, con los antígenos proteicos inmovilizados, fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución al 2% p/v de ECL Advance Blocking Agent (Amersham Biosciences) preparada en solución salina tamponada con Tris y Tween (TBS-T, 0,1% v/v de Tween® 20, Bio-Rad) añadido a la solución TBS 1X: 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl. Este reactivo de bloqueo es provisto

con el ECL Advance® Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences) que fue utilizado para la inmunodetección de las proteínas. Tras eliminar la solución de bloqueo y lavar 3 veces con PBS-T, las membranas fueron incubadas con una dilución 1:1000 en PBS-T del anticuerpo primario de conejo específico y, tras tres nuevos lavados, incubadas con una dilución 1:2000 a 1:5000 en PBS-T del anticuerpo secundario de cabra anti-rabbit-HRP (Sigma) marcado con peroxidasa. Por último, se eliminó el anticuerpo de detección, se lavó la membrana tres veces con PBS-T y la membrana fue revelada utilizando el sistema ECL Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare). Para la detección de la luminiscencia se utilizaron películas Super RX Azul 18x24 (Fujifilm) y la reveladora AGFA\_CURIX- CP 1.000 (Agfa).



**Ilustración 17. Tinción con Azul de Coomassie y *Western blotting* de 6XHis\_β-FSH.**

La banda superior (flecha) en la tinción con Azul de Coomassie coincidente con marcador de peso molecular = 30 KDa, fue atribuida a formación de dímeros de la subunidad 6XHis\_β-FSH

### 3.2.2. Obtención de FSH recombinante de codorniz (ccrFSH)

#### 3.2.2.1. Diseño de la construcción de ADN y subclonación en vector de expresión eucariota

Con el objetivo de obtener una FSH recombinante biológicamente activa y con propiedades farmacocinéticas adecuadas para su utilización en la inducción del ciclo ovárico en aves, se diseñó un ADNc para la producción de FSH recombinante de codorniz (ccrFSH) en forma monomérica, de modo que las subunidades alfa y beta de dicha hormona estuviesen unidas covalentemente mediante una secuencia aminoacídica de unión (*linker*) (Ilustración 18).

La secuencia sintetizada incluyó también la optimización de codones *in silico* por parte del fabricante (GeneArt), mediante el uso del software GeneOptimizer® de su propiedad. Este proceso de optimización comprende una combinación de diferentes parámetros, como el contenido GC, uso de codones “amistosos” con la línea celular, eliminación de motivos inestables, etc., que aportan estabilidad al ARNm y maximizan la eficacia de traducción, lo que en definitiva mejora el rendimiento de la expresión de proteínas sistemas heterólogos (Fath *et al.*, 2011).



**Ilustración 18. Esquema del gen sintético ccrFSH**

Las secuencias sintéticas optimizadas se diseñaron en base a las secuencias de referencia depositadas en bases de datos públicas:

- Subunidad  $\beta$  de FSH de codorniz (*Coturnix coturnix*): GenBank AB086952.1
- subunidad  $\alpha$  común a FSH y LH de codorniz (*Coturnix coturnix*): GenBank S70833.1

La secuencia del péptido señal de la subunidad  $\alpha$ -FSH/LH, según predicción realizada con la aplicación SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>), fue eliminada. La subunidad  $\beta$ -FSH se unió por su carboxilo terminal al extremo amino terminal de los 28 aminoácidos del extremo carboxilo terminal (CTP) de la gonadotropina coriónica humana (HCG):

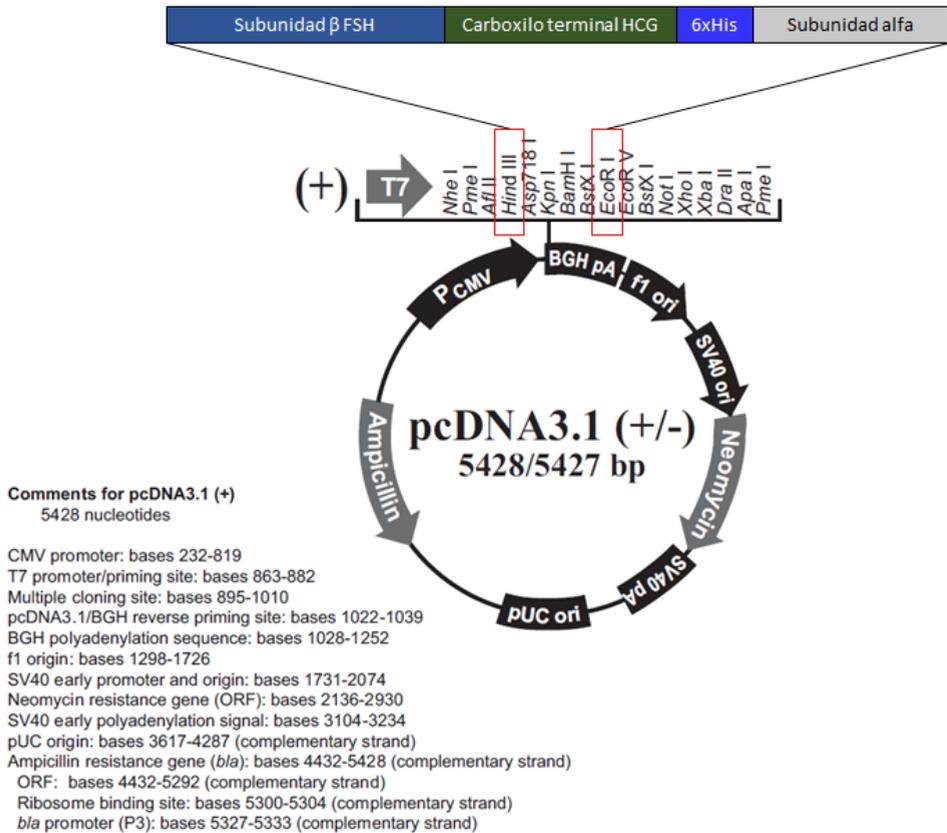
**C-terminal HCG: NH<sub>2</sub>-SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ-COOH**

Además, entre la subunidad beta y el carboxilo terminal de la HCG, se insertó una secuencia de polihistidinas (6xHis), para la posterior purificación de ccrFSH por cromatografía de afinidad IMAC utilizando columnas que contienen resinas unidas a cationes divalentes (Ni<sup>2+</sup>). Por último, se incluyeron en los extremos de la secuencia sintética las dianas de restricción *Hind*III (AAGCTT) y *Eco*RI (GAATTC) para posterior subclonación del gen sintético en el vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen).

La secuencia de aminoácidos ccrFSH codificada por este gen sintético fue la siguiente:

**MKTLN**CYVLL**FCWKAIC**CYS**CEL**TNITIAVEREECEMCITVNATWCSGYCFTRDPV  
 YKYPPVSSVQ**QIC**TFKEVVYETVKIPGCGDHPESFYSPVATGCHCETCDTDS**TDC**  
**TVRGLGPSYCS**FSHNGSN**QSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ**HHHHH**FPD**  
**GEFLMQGCPECKLGENRFFSKPGAPIYQCTGCCFSRAYPTPMRSKKTMLVPKNITS**  
**EATCCVAKAF**TKITLKD**NVK**IE**NHTDCHCSTCY**YHKS

- En rojo: péptido señal de la subunidad  $\beta$ -FSH
- En negro: subunidad  $\beta$ -FSH madura
- En marrón: CTP
- En azul: 6XHis
- En verde: subunidad  $\alpha$ -FSH/LH madura

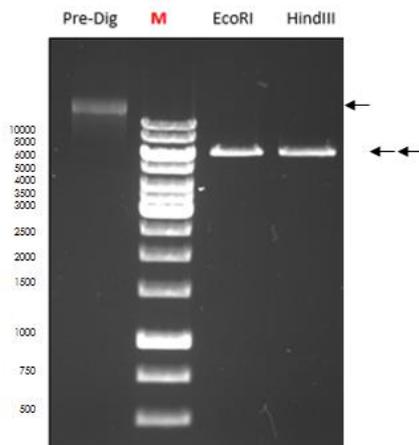


**Ilustración 19. Esquema del vector pcDNA3.1. Sitio de subclonación de ccrFSH**

### 3.2.2.1.1. Construcción del vector de expresión

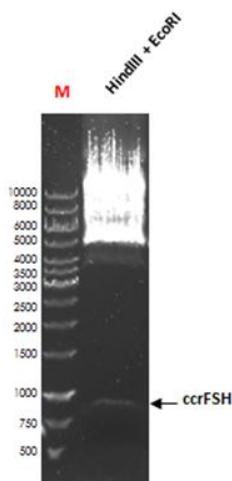
La construcción del vector de expresión fue realizada mediante los siguientes pasos secuenciales:

- 1) Digestión enzimática *Hind*III y *Eco*RI del vector de expresión pcDNA3.1(+) (Invitrogen) y electroforesis en gel de agarosa para comprobación de la digestión completa del vector:



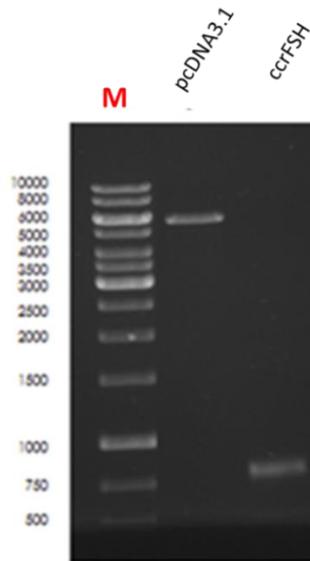
**Ilustración 20. Electroforesis en gel de agarosa. Digestión *HindIII* y *EcoRI* de *pcDNA3.1(+)***

- 2) Doble digestión enzimática *HindIII* / *EcoRI* del vector suministrado por el proveedor GeneArt para aislamiento de la secuencia sintética de interés (741pb) que codifica la proteína *ccrFSH*. *ccrFSH* fue subclonada en un vector estándar del proveedor cuya información no fue suministrada. Se realizó electroforesis en gel de agarosa para comprobación de la digestión y aislamiento del fragmento de DNA de interés (*ccrFSH*).



**Ilustración 21. Electroforesis en gel de agarosa. Digestión *HindIII*/*EcoRI* del vector suministrado por el proveedor**

- 3) Verificación de los fragmentos digeridos y ligación de ccrFSH en el vector pcDNA3.1(+). Transformación de la construcción pcDNA3.1\_ccrFSH en bacterias DH10 $\alpha$  y aislamiento en placa de colonias para su posterior verificación por PCR y digestión *Hind*III / *Eco*RI tras purificación del ADN plasmídico.



**Ilustración 22. Electroforesis en gel de agarosa tras digestión de pcDNA3.1\_ccrFSH**

Digestión *Hind*III / *Eco*RI de pcDNA3.1 tras purificación de ADN plasmídico.

### 3.2.2.1.2. Secuenciación y análisis informático

El gen sintético de interés (ccrFSH), subclonado en el vector suministrado por el proveedor, incluyó un informe con los resultados de su secuenciación, comprobándose en el mismo que la secuencia subclonada era correcta y completamente correspondiente con el diseño realizado.

Dado que la subclonación en el vector de expresión pcDNA3.1(+) se realizó por digestión del inserto ccrFSH y de este vector con enzimas compatibles y posterior ligación, no se esperaron cambios en la secuencia nucleotídica de ccrFSH. Sin embargo, con el fin de incrementar la seguridad

sobre dicha secuencia, el vector pcDNA3.1(+)\_ccrFSH fue secuenciado por la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid), mediante oligonucleótidos cebadores universales para el promotor T7 (5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3), verificándose así la exactitud de la secuencia nucleotídica.

Por otro lado, se procedió a la traducción *in silico* de esta secuencia mediante la herramienta bioinformática ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>), y al alineamiento de esta secuencia aminoacídica con la esperada. La coincidencia en la secuencia aminoacídica de estas dos secuencias fue del 100%.

### 3.2.2.1.3. Protocolo de digestión de los vectores

---

Tanto el vector pcDNA3.1(+) como el GENEART-estándar que contiene la secuencia del gen sintético ccrFSH, se digirieron separadamente en tubos Eppendorf de 0.5ml con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI* durante 1 h a 37°C en solución de digestión cuya composición se detalla en la siguiente tabla:

**Tabla 8. Composición solución para digestión de plásmidos eucariotas.**

Componente	Volumen	Concentración Final
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	75 µl	---
Tampón R (ThermoFisher) 10X	10 µl	1X
Plásmido [1 µg/µl]	10 µl	0,1 µg /µl
Enzimas <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> 10 U/µl (ThermoFisher)	5 µl	0,5 U/µl
<b>Volumen Final</b>	<b>100 µl</b>	

### 3.2.2.1.4. Protocolo ligación del vector pcDNA3.1(+) digerido con el inserto ccrFSH

Las ligaciones se realizaron con los productos digeridos y posteriormente purificados a partir de bandas de agarosa con el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ADN fue finalmente eluído en H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y verificado en electroforesis en gel de agarosa al 1% para su posterior utilización en reacción de ligación.

La reacción de ligación se realizó durante 20 minutos a 25°C en tubo Eppendorf de 0.5 ml en la solución cuyos componentes se indican en la siguiente tabla:

**Tabla 9. Composición solución de ligación para ccrFSH/pcDNA3.1(+)**

Composición del tampón Quick Ligation 2X: Tris-HCl 132 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, 2 ditiotreititol mM, ATP 2 mM, polietilen glicol 15%, pH 7,6.

Componente	Volumen
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	7,0 µl
Tampón 2X Quick Ligation (NEBL)	10 µl
Vector pcDNA3.1(+) digerido ( 40-50 ng)	1 µl
DNA ccrFSH (banda purificada del gel agarosa)	2 µl
Enzima Quick T4 DNA ligasa	1 µl
Volumen Final	21 µl

El producto de la ligación fue posteriormente utilizado para la transformación mediante choque térmico de bacterias competentes DH5α (Invitrogen). Posteriormente, las bacterias fueron sembradas en placas Petri de agar con LB y ampicilina (Sigma). Las placas fueron incubadas en estufa a 37°C durante 24 horas para el posterior aislamiento de colonias individuales y comprobación por PCR de la presencia del inserto.

### 3.2.2.1.5. Protocolo Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

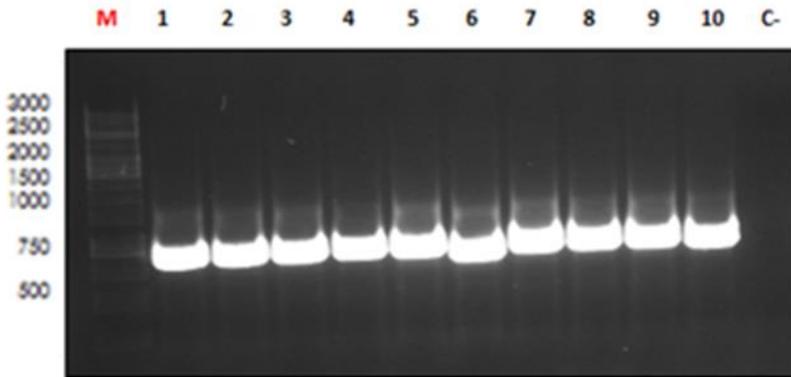
Las colonias bacterianas obtenidas tras la etapa de ligación fueron analizadas por PCR para comprobar la existencia de la construcción pcDNA3.1(+)\_ccrFSH en su interior. Se utilizó la ADN polimerasa AmpliTaq® DNA polimerasa (Perkin Elmer). Los componentes de la reacción se mezclaron en tubos PCR de 0.2 ml (Axigen) en las proporciones que se indican en la siguiente tabla:

**Tabla 10. Composición solución PCR para comprobación del inserto ccrFSH.**

Componente	Volumen	Concentración Final
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	26 µl	---
Tampón PCR AmpliTaq 10X	4 µl	1X
Mezcla de dNTPs (1:1:1:1) 10 mM C/U	0,8 µl	0,2 mM c/u
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2,4 µl	1,5 mM
Oligonucleótido (sentido) (10 µM)	1 µl	0,25 µM
Oligonucleótido (antisentido) (10 µM)	1 µl	0,25 µM
DNA (1 colonia resuspendida en 100µl H <sub>2</sub> O)	4 µl	---
Enzima AmpliTaq® (5 U/µl)	0,8 µl	0,1 U/ µl
Volumen Final	40 µl	

Los tubos con la mezcla se sometieron a PCR en termociclador (GeneAmp PCR System 9600; Perkin Elmer), programado del siguiente modo:

<b>1 CICLO</b>	<b>2 MIN</b>	<b>95°C</b>
<b>35 CICLOS</b>	30 seg	94°C
	1 min	45 °C
	2 min	72°C
<b>1 CICLO</b>	7 min	72°C



**Ilustración 23. Producto de PCR (ccrFSH) a partir de colonia tras transformación con pcDNA3.1\_ccrFSH**

### **3.2.2.2. Expresión de ccrFSH en células de mamífero CHO**

La construcción pcDNA3.1(+)\_ccrFSH generada fue posteriormente utilizada para la producción de la gonadotropina recombinante ccrFSH en células de ovario de hámster chino (CHO). Para el presente trabajo, se utilizó la línea celular FreeStyle™ CHO-S Cells (Invitrogen) de crecimiento en suspensión.

#### **3.2.2.2.1. Protocolo para el cultivo, mantenimiento y uso de las células**

---

El almacenamiento de la línea celular se llevó a cabo en nitrógeno líquido, en viales con  $1 \times 10^7$  células en 1 ml de medio FreeStyle™ CHO Expression Medium 90% y dimetildulfóxido (DMSO) 10%.

El medio de cultivo utilizado fue el FreeStyle™ CHO Expression Medium (Invitrogen) suplementado con L-glutamina (Invitrogen) hasta una concentración final de 8 mM al que se añadieron 5 ml/l de una solución

100X (5000 unidades/ml de penicilina y 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina) de Penicilina / Estreptomicina (Invitrogen).

La descongelación y cultivo de las células antes de producir cada lote de gonadotropina recombinante se realizó según el siguiente proceso:

- 1) Extracción del criovial de células del nitrógeno líquido y descongelación rápida en baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- 2) Previo a la completa descongelación, descontaminación del exterior del vial con etanol al 70%. Resuspensión suave de los grumos con una pipeta y transferencia de todo el contenido del tubo a un matraz estéril desechable (Erlenmeyer de policarbonato) de 125 ml de capacidad (Corning) con 30 ml de medio de expresión FreeStyle™ CHO suplementado, y precalentado a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- 3) Incubación de las células en estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$ , en atmósfera humidificada, con 8% de  $\text{CO}_2$  y en plataforma giratoria orbital a 125 rpm (POS-300 Orbital shaker 50-300 rpm).
- 4) Trasncurridas 24h, se realizó determinación del número de células viables y totales. La viabilidad celular fue  $\geq 70\%$ .
- 5) Subcultivo de las células 24-48 horas después de su descongelación, sembrando  $0.3 \times 10^6$  células viables/ml en medio de expresión suplementado y precalentado en matraces Erlenmeyer de policarbonato de 125ml, desechables y estériles, con 40 u 80 ml de volumen total de suspensión celular, respectivamente.

Las células se subcultivaron cada 48-72 horas tras alcanzarse densidades de  $1-1.5 \times 10^6$  células viables/ml aproximadamente. Se utilizaron matraces Erlenmeyer estériles desechables de policarbonato (125 ml) con tapón ventilado, conteniendo 40 ml de volumen total de suspensión celular según el siguiente proceso:

- 1) Recuento de células viables y totales, y posterior cálculo de la dilución necesaria para el sembrado de los nuevos matraces a  $0,05-0,2 \times 10^6$  células viables/ml.
- 2) Dilución de las células en medio de expresión FreeStyle™CHO, suplementado y precalentado, para obtener una densidad celular final de  $0,05-0,2 \times 10^6$  células viables/ml en el volumen final deseado.
- 3) Incubación de los matraces en estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, en atmósfera humidificada con 8% de CO<sub>2</sub>, en agitación mediante plataforma orbital a 120 rpm.
- 4) Repetición de los pasos 1-3 para mantenimiento o expansión de las células

Para la congelación, tras etiquetar los crioviales y preparar el medio de congelación (FreeStyle™ CHO Expression Medium 0.9 ml + DMSO 0.1 ml), se siguió el siguiente protocolo:

- 1) Cultivo de células en matraces agitadores, recolectando a densidad celular de  $1 \times 10^6$  células viables/ml. Transferencia de las células a un tubo de centrifuga cónico estéril (Falcon 50 ml; Beckton Dickinson).
- 2) Recuento de células viables y totales en cámara de Neubauer y cálculo del volumen de medio de congelación requerido para obtener una densidad celular final de  $1 \times 10^7$  células viables/ml.
- 3) Centrifugación a  $100 \times g$  durante 5 minutos a temperatura ambiente y aspiración o decantación cuidadosa del medio sobrenadante.
- 4) Resuspensión de las células en el volumen predeterminado de medio de congelación frío.
- 5) Colocación de los crioviales en gradilla y adición de una alícuota de 1 ml de la suspensión celular en cada tubo.
- 6) Congelación de las células a -80°C y transferencia de los viales congelados a nitrógeno líquido a las 48-72h para el almacenamiento a largo plazo.

La viabilidad de las células en suspensión se determinó en función de la integridad de sus membranas celulares, evaluando para ello la capacidad de exclusión de colorantes que muestran las mismas cuando se encuentran intactas. Para este fin se utilizó el método basado en la tinción con colorante Azul Tripán. Esta determinación rutinaria de las células no teñidas viables se realizó mediante recuento visual en cámara de Neubauer (Hausser Scientific). Se añadió 0,1 ml de Azul Tripán (400 mg de colorante vital Trypan blue, 810 mg NaCl, 60 mg K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mg metil phidroxibenzoato en 100 ml H<sub>2</sub>O; pH: 7,2-7,3, Invitrogen) por cada 0,9 ml suspensión celular. Tras 5 minutos, la mezcla se cargó en la cámara y se procedió al recuento e identificación de células teñidas (no viables).

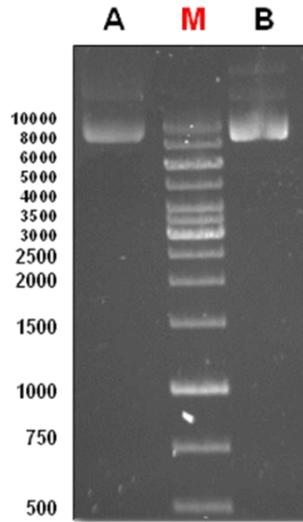
#### 3.2.2.2.2. Protocolo para la preparación de Maxi preparaciones de ADN

Para la transfección celular con el plásmido pcDNA3.1(+)\_ccrFSH, la obtención de ADN plasmídico a gran escala y en condiciones de bajo contenido de endotoxinas, se llevó a cabo utilizando el kit comercial GeneJET Endo-Free Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Fisher Scientific), basado en una modificación del principio de lisis alcalina.

El procedimiento fue el siguiente:

1. Preparación del preinóculo: Se sembró a partir de una colonia aislada de placa correspondiente a las bacterias DH5a transformadas con el plásmido pcDNA3.1(+)\_ccrFSH en matraz de vidrio de 100 ml de capacidad con 20 ml de medio LB con ampicilina a 100 µg/ml y se mantuvo durante toda la noche a 37°C con agitación a 125 rpm.
2. Adición de 5 ml del preinóculo del punto 1 a un matraz de cristal de 2l con 500 ml de medio LB-ampicilina (100 µg/ml), seguido de incubación durante 16h a 37°C en agitación 125 rpm.

3. Recolección del cultivo, centrifugación a 4°C y 16.000 x g, eliminación del sobrenadante (medio de cultivo) y conservación del sedimento bacteriano hasta su procesamiento.
4. Purificación del ADN plasmídico con el kit comercial GeneJET Endo-Free Plasmid Maxiprep Kit (Fermentas; actualmente, ThermoFisher Scientific), siguiendo las recomendaciones y protocolos del fabricante. En primer lugar se procede a la lisis alcalina del pellet bacteriano. A continuación, el lisado es neutralizado, para reanillamiento del ADN y precipitación de las proteínas y del ADN cromosómico. Los restos celulares y el precipitado son separados por centrifugación, cargándose posteriormente el sobrenadante que contiene el ADN plasmídico en la columna de purificación incluida en el kit. La alta concentración de sales del lisado crea condiciones apropiadas para la unión del ADN plasmídico a la membrana de sílice en la columna de centrifugación. El ADN adsorbido es lavado para eliminar contaminantes, usando dos soluciones de lavado con isopropanol y etanol respectivamente, lo que permite la eliminación de las sales y permite que el ADN purificado sea eluido con el tampón de elución en condiciones idóneas para su posterior uso en la transfección de las células CHO.
5. Filtración del ADN plasmídico purificado a través de fitros de 0.22 µm (Pall Life Sciences o Sarstedt) para esterilización de la solución.
6. Cuantificación del DNA plasmídico en tampón Tris-HCl 10 mM de pH 8,0 mediante espectrofotometría (NanoDrop® ND-1000) a la longitud de onda de 260 nm, determinando su pureza en base a la relación de absorbancias a 260 y 280 nm ( $A_{260} / A_{280} = 1,8 - 1,9$ ). En la electroforesis en gel de agarosa se apreciará una banda dominante de ADN plasmídico superenrollado.



**Ilustración 24. Electroforesis en gel de agarosa de pcDNA3.1 purificado.**

Imagen en gel de agarosa de la forma superenrollada de pcDNA3.1\_ccrFSH tras purificación de ADN plasmídico a partir de Maxi Prep. M = Marcador de bp; A = 0,5 µg de ADN; B = 0,7 µg de ADN

Una vez cultivadas las células FreeStyle™ CHO-S y preparado el ADN plasmídico pcDNA3.1(+)\_ccrFSH, se procedió a la transfección celular siguiendo los protocolos recomendados por el proveedor, según se indica a continuación:

**3.2.2.2.3. Protocolo para la transfección del ADN pcDNA3.1(+)\_ccrFSH en células CHO**

---

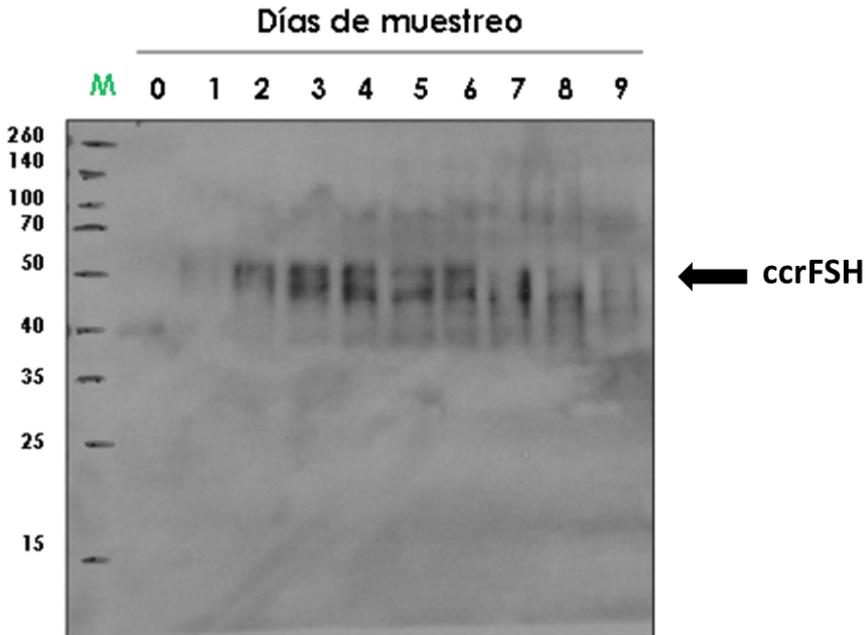
Para la producción de cada lote de ccrFSH se transfectaron las células CHO en suspensión mediante el siguiente procedimiento:

1. Subcultivo de las células CHO a  $5-6 \times 10^5$  células/ml 24 horas antes de la transfección. Colocación de los matraces con las células FreeStyle™ CHO-S a la densidad indicada en un

volumen de 30 ml en plataforma giratoria orbital a 125 rpm a 37°C, en estufa al 8% de CO<sub>2</sub> y atmósfera humidificada.

2. En el momento de la transfección, la densidad celular debe ser de aproximadamente 1.2-1.5x10<sup>6</sup> / ml. Dilución de las células a 1x10<sup>6</sup> / ml. Para asegurar adecuados resultados de transfección, la viabilidad de las células debe ser superior al 95%. Adición de 30 ml de suspensión celular en cada matraz de agitación de 125 ml.
3. Inversión suave, varias veces (sin vórtex), del tubo con el reactivo de transfección FreeStyle™ MAX Reagent (Invitrogen).
4. Dilución de 37.5 µg de ADN plásmido en OptiPro™ SFM (Invitrogen) a un volumen total de 0.6 ml y mezcla (Tubo A). En un tubo separado, diluir 37.5 µl de reactivo de transfección FreeStyle™ MAX en Opti-Pro™ SFM a un volumen total de 0.6 ml (Tubo-B) y mezclar suavemente invirtiendo el tubo. Agregar inmediatamente reactivo de transfección FreeStyle™ MAX diluido (Tubo A) al diluido de la solución de ADN (Tubo B) para obtener un volumen final total de 1.2 ml. Mezclar suavemente.
5. Incubación de la mezcla DNA-FreeStyle™ MAX (Tubos A+B) durante 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos. No exceder los 20 minutos.
6. Agregar lentamente la mezcla de 1,2 ml que contiene el complejo DNA-FreeStyle™ MAX en el matraz de 125 ml que contiene las células mientras se gira lentamente el matraz.
7. Incubación de los cultivos de células transfectadas a 37°C y 8% de CO<sub>2</sub> en plataforma con agitación orbital a 125 rpm. No se requiere cambiar ni complementar el medio de cultivo durante los primeros 7 días de cultivo post transfección.
8. La expresión de ccrFSH se detectó en el medio de cultivo por Western Blot a partir del día 2 post transfección utilizando el anticuerpo anti-β-FSH desarrollado y siguiendo el protocolo descrito previamente. Se observó una señal máxima entre los días 3 y 6 tras la transfección.

9. Seis días tras la transfección, los cultivos se centrifugaron a 3500 rpm con el fin de separar las células del sobrenadante. Este se conservó refrigerado a 4°C hasta su utilización (24-48h) en el proceso de purificación de la gonadotropina recombinante ccrFSH.



**Ilustración 25. Western blotting seguimiento expresión ccrFSH.**

*Western Blotting* de medio de cultivo recogido los días 0-9 tras transfección de CHO con pCDNA3.1\_ccrFSH.

En los experimentos preliminares se incluyó un control positivo (pCMV SPORT-βgal) y un control negativo (sin ADN ni Reactivo FreeStyle™ MAX), para una mejor evaluación de los resultados.

### 3.2.2.3. Purificación de las gonadotropinas recombinantes aviares

El medio de cultivo recogido en el punto anterior fue posteriormente utilizado para la purificación de la gonadotropina recombinante ccrFSH.

Los sobrenadantes ( $V = 1$  litro de medio de cultivo) de las células CHO transfectadas transitoriamente con el vector de expresión pcDNA3.1(+)\_ccrFSH se recogieron el día 6<sup>o</sup> post transfección. La separación de las células y su sobrenadante se realizó por centrifugación durante 15 minutos a 3500 rpm y 4°C en tubos de 50 ml. Las células se desecharon y el medio de cultivo (~1000ml) se dividió en 10 alícuotas. A continuación, se realizaron 10 carreras de purificación siguiendo el protocolo descrito anteriormente, inyectando cada vez un volumen de 100 ml de medio de cultivo en el equipo ÄKTApurifier (GE Healthcare). De cada proceso de purificación se obtuvieron 14 ml, lo que resultó en una concentración 7X (teórico) de la hormona respecto al medio de cultivo original. El volumen total obtenido en los 10 ciclos de purificación fue de 140 ml.

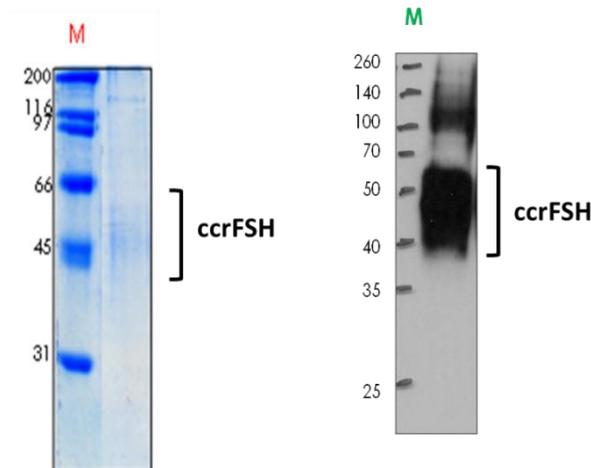
La muestra resultante fue posteriormente dializada frente a tampón fosfato salino (PBS), utilizando membranas de diálisis de 12-14000 MWCO (Iberlabo) que contenían la muestra en su interior y selladas en sus extremos con pinzas. La membrana fue sumergida durante toda la noche en vaso de precipitado de 1l con PBS a 4° C y en agitación. La muestra final resultante se sometió a un filtrado de 0.22  $\mu\text{m}$  para esterilización (Filtropur S 0,2  $\mu\text{m}$ ; Sarstedt), se analizó en geles SDS-PAGE y se cuantificó (Bradford) para estimar el rendimiento del proceso.

El rendimiento obtenido por un litro de cultivo de células CHO transfectadas fue el siguiente:

**Tabla 11. Rendimiento tras purificación de ccrFSH a partir de 1 l de cultivo.**

Proteína recombinante	Concentración	Volumen	Cantidad total
ccrFSH	14,3 µg/mL	140,0 mL	2,002 mg

La detección de crFSH purificada se llevó a cabo mediante electroforesis en gel SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie y *Western blotting* con anti-β-FSH, anti-β-LH y anti-α-FSH/LH. En la tinción con Azul de Coomassie pudo apreciarse una región teñida en la zona entre 45 y 60 KDa compatible con lo esperado en ccrFSH. En el *Western blotting*, se apreció señal tras incubación con anti-β-FSH y anti-α-FSH/LH, pero no cuando la membrana se incubó con anti-β-LH. La señal en barrido, en la región de peso molecular entre 45 y 60 KDa coincidió con la observada en la tinción con Azul Coomassie y fue semejante a la obtenida por otros grupos en la expresión de FSHs (Klein et al., 2003). Esta señal en barrido es atribuida a la presencia de moléculas con diferente estado de glicosilación y, por tanto, con diferentes pesos moleculares (Butnev et al., 2015).



**Ilustración 26. Tinción con Azul de Coomassie y *Western blotting* de ccrFSH**

En la imagen izquierda, tinción con Azul de Coomassie del gel SDS-PAGE. En la derecha, *Western blotting* tras incubación con anti-β-FSH. Carga en pocillo: 8µl de proteína purificada + 8µl tampón de carga (2X).

### **3.2.3. Purificación de hormonas hipofisarias**

La adenohipófisis aviar se encuentra alojada en la silla turca esfenoidal (como en mamíferos), mientras la pars tuberalis y la neurohipófisis ocupan una posición craneal fuera de esta estructura ósea (Sasaki et al., 2003). Esta circunstancia permite la obtención del tejido adenohipofisario sin tejido neurohipofisario al coleccionar sólo el tejido presente en el interior de la silla turca.

#### **3.2.3.1. Obtención de adenohipófisis de pavo**

Para la obtención de FSH y LH hipofisarias de pavo, se procedió, como paso previo, a la recolección y almacenamiento de 10.000 adenohipófisis de esta especie doméstica para su posterior procesado.

Tras la sección coronal del cráneo a nivel del borde posterior del globo ocular y localización de la silla turca en el suelo de la cavidad craneal, las adenohipófisis se extrajeron con pinzas quirúrgicas. Las cabezas de estos animales fueron proporcionadas por mataderos industriales y utilizadas para la extracción de adenohipófisis en las cuatro horas posteriores al sacrificio y en cámara fría (4°C). El peso de los animales osciló entre los seis y doce kilogramos, y su edad entre 15 y 21 semanas.

Las 10.000 adenohipófisis fueron almacenadas regularmente en acetona a 4°C durante un máximo de seis meses hasta su purificación.

La purificación de las gonadotropinas se realizó en colaboración con la empresa Protein Alternatives S.L. (Madrid), especializada en la producción y purificación de proteínas

### 3.2.3.2. Extracción de las glicoproteínas hipofisarias

La extracción de la fracción glicoproteica a partir del tejido adenohipofisario según el procedimiento descrito en 1969 (Hartree y Cunningham, 1969), y que se resume a continuación.

Las adenohipófisis se extrajeron de la acetona y se secaron al aire (temperatura ambiente). Una vez secas, fueron pulverizadas por medios físicos (aplastamiento en mortero de porcelana). El polvo resultante de las 10.000 adenohipófisis pesó 39,6 gramos, lo que supone un peso aproximado de 4 mg/hipófisis. Los 39,6 g de polvo hipofisario fueron posteriormente homogeneizados en 400 ml del tampón de extracción: 6% Acetato de amonio, pH 5.1, en 40% de etanol (v/v).

El proceso de extracción se llevó a cabo mediante homogeneizador Ultra-Turrax T10 basic (IKA, Germany) a 4°C durante veinte minutos. Una vez homogeneizado el polvo, se mantuvo en agitación (agitador magnético) a 4°C durante 24 horas. Tras centrifugación (20 min a 1.800 x g) se separó el sobrenadante y se guardó a 4°C (1ª Extracción). Se añadieron 200 ml del tampón de extracción al pellet, se homogeneizó de nuevo y se dejó en agitación a 4°C durante 24 horas más. Tras una segunda centrifugación en iguales condiciones a las utilizadas en el paso anterior, el sobrenadante obtenido (2ª Extracción) se mezcló con la 1ª Extracción (Extracción Total).

Posteriormente se añadieron dos volúmenes de etanol (96%) enfriado a -20°C, lentamente y en agitación. La disolución se mantuvo en agitación (agitador magnético) durante 24 horas, al término de las cuales, y tras centrifugación (30 min; 1.800 x g), se obtuvo el precipitado glicoproteico esperado. El precipitado fue lavado con etanol (96%), etil éter y acetona, secado en vacío y resuspendiendo en 210 ml de solución 50 mM Tris-HCl pH 8,0. El 40% de esta disolución (~80 ml) fue almacenado en alícuotas de 1

ml a  $-80^{\circ}\text{C}$  y recibió la denominación EGP. El resto, se utilizó para separación cromatográfica según se describe en el apartado siguiente.

### **3.2.3.3. Purificación de las glicoproteínas hipofisarias mediante cromatografía de intercambio iónico**

La purificación de las hormonas LH y FSH se llevó a cabo partiendo del 60% del extracto glicoproteico resuspendido en tampón 50 mM Tris-HCl pH 8,0. Se empleó una columna HiLoad 26/10 Q de intercambio aniónico (GE Healthcare) y el equipo de cromatografía AKTA Purifier 10 (GE Healthcare). El extracto a purificar fue previamente clarificado mediante centrifugación durante 30 minutos a  $10000 \times g$  y filtrado ( $0.45 \mu\text{m}$ ) antes de la carrera cromatográfica.

En la cromatografía se empleó como tampón de unión: 50 mM Tris-HCl pH 8,0 y como tampón de elución: 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8,0. En cada proceso cromatográfico se cargaron 50 ml de solución de extracto glicoproteico y se lavó la columna con 4 CV (4 volúmenes de columna) antes de proceder con el gradiente de elución, en 10 CV de 0% a 100% de tampón de elución. Se recogieron fracciones de 12.5 ml, tanto de las proteínas no retenidas como del gradiente de elución para su posterior análisis mediante tinción con Azul de Coomassie, inmunodetección por *Western blotting* con los anticuerpos específicos y cuantificación de las glicoproteínas purificadas mediante ensayo de Bradford.

Los tampones finales para cada una de las hormonas nativas purificadas fueron:

- 50 mM Tris-HCl pH 8,0 en el caso de la LH.
- 50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, pH 8,0 en el caso de la FSH.

### 3.2.3.4. Inmunodetección de las glicoproteínas hipofisarias purificadas

Para la detección mediante *Western blotting* de las gonadotropinas hipofisarias purificadas se emplearon los sueros policlonales de conejo anti- $\beta$ -FSH y anti- $\beta$ -LH desarrollados previamente. La electroforesis en geles SDS-PAGE de las muestras a analizar se llevó a cabo en gel de acrilamida (12.5%) a 200 V durante 45 minutos. Posteriormente se transfirieron las proteínas del gel a membrana de nitrocelulosa según se describió previamente. La membrana con las proteínas transferidas fue bloqueada a continuación durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación con una solución PBS + 0.05% Tween + 5% leche desnatada en polvo. Tras el bloqueo de las membranas se añadieron los anticuerpos correspondientes (anti- $\beta$ -LH o anti- $\beta$ -FSH) a una dilución 1:1000 en el mismo tampón empleado durante el bloqueo y se incubó con agitación durante 1 hora. Tras la incubación con el anticuerpo primario se realizaron tres lavados con tampón PBS + Tween 0.05% antes de añadir el anticuerpo secundario (Goat Anti Rabbit IgG-HRP ,Sigma-Aldrich) diluido 1:10.000 en PBS + 0.05% tween + 1% leche desnatada en polvo. Tras esta incubación se procedió a lavar 3 veces con PBS + Tween 0.05% y un lavado final con PBS.

El revelado de la reacción se llevó a cabo usando el reactivo quimioluminiscente ECL (GE Healthcare).

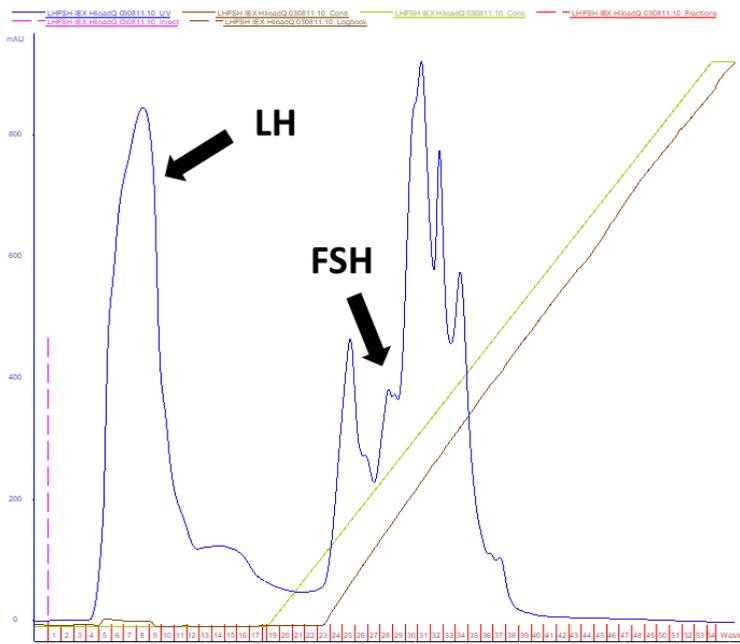
**Tabla 12. Rendimiento proteico de fracciones purificadas a partir de adenohipófisis de pavo (método de Bradford)**

<b>Muestra</b>	<b>Concentración mg/ml</b>	<b>Volumen (ml)</b>	<b>Proteína (mg)</b>
1ª Extracción	2,284	375	856,5
2ª Extracción	0,96	175	168
Extracción Total	1,916	550	1053,8

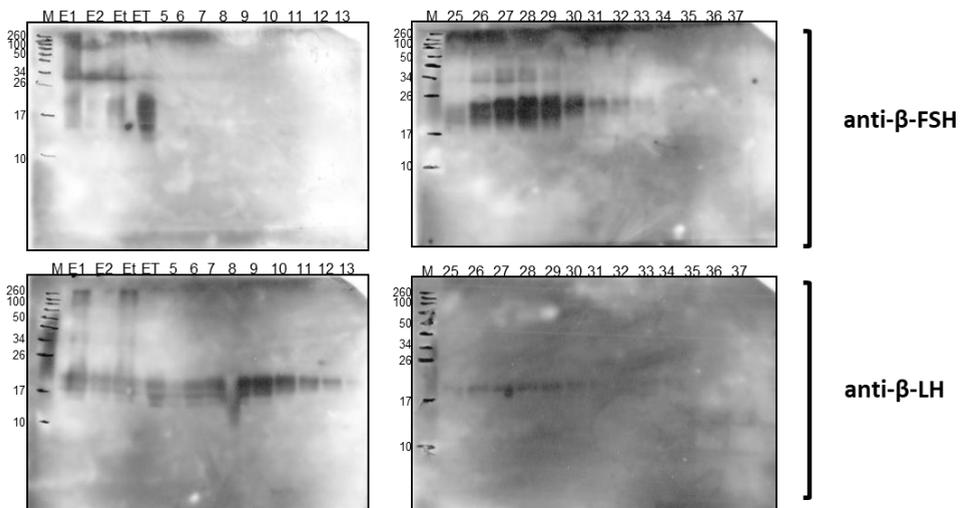
Sobrenadante tras precipitación	0,268	1600	428,8
Extracto Total tras precipitación (EGP) y resuspensión	2,288	210	480,5
LH purificada (LH IEX)	0,261	253,5	65,8
FSH purificada (FSH IEX)	0,402	176	70,7

Las fracciones denominadas LH IEX y FSH IEX son el resultado de la combinación de las fracciones inmunorreactivas (por *Western blotting*) frente a anti- $\beta$ -LH y anti- $\beta$ -FSH respectivamente. Según esta técnica, la fracción FSH (FSH IEX) mostró contaminación por LH, mientras la fracción LH (LH IEX) no mostró contaminación por FSH.

La electroforesis en gel SDS-PAGE mostró proteínas contaminantes en las fracciones de FSH IEX

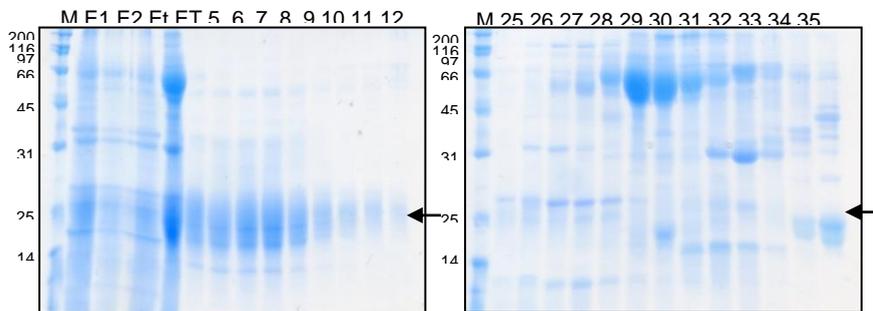


**Ilustración 27. Cromatograma obtenido en cromatografía de intercambio iónico a partir de extracto glicoproteico de adenohipófisis de pavo**



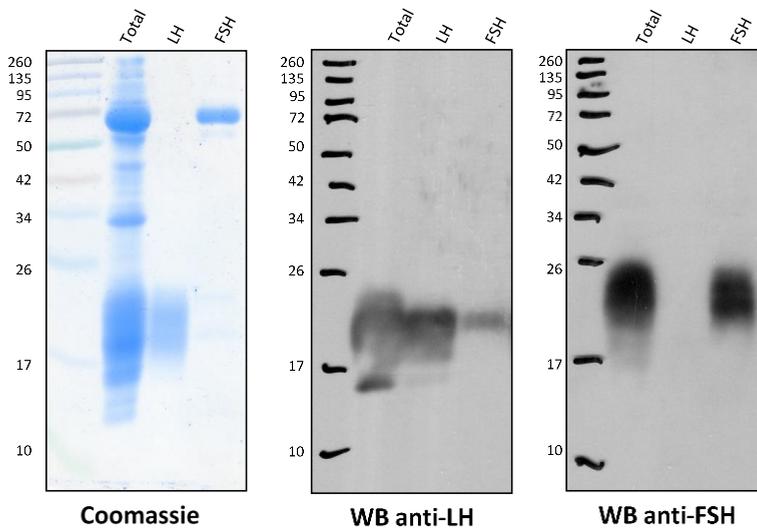
**Ilustración 28. Western blotting de las fracciones cromatográficas tras incubación con anti-β-FSH y anti-β-LH**

E1= 1ª Extracción, E2= 2ª Extracción, Et= E1 + E2, ET= Extracción Total resuspendido tras la precipitación. Números representan diferentes fracciones cromatográficas obtenidas. Se aprecia señal LH en las fracciones en que predomina señal FSH (25 - 33).



**Figura 2. Análisis por tinción con Azul de Coomassie de las fracciones de la purificación por intercambio iónico**

E1: primera extracción, E2: segunda extracción, Et: E1 + E2, ET: extracto resuspendido tras la precipitación.



**Figura 3.** Análisis por tinción con Azul de Coomassie y *Western blotting* de las fracciones EGP, LH IEX y FSH IEX obtenidas a partir de adenohipófisis de pavo

### 3.2.4. Ensayo *in vitro*

Para la valoración de la actividad biológica de las gonadotropinas aviares recombinantes, se puso a punto la técnica de incubación de células de la granulosa obtenidas a partir de folículos ováricos de gallina, y la determinación de la concentración de progesterona secretada por estas células en respuesta al estímulo hormonal específico FSH y LH (Hammond *et al.*, 1981).

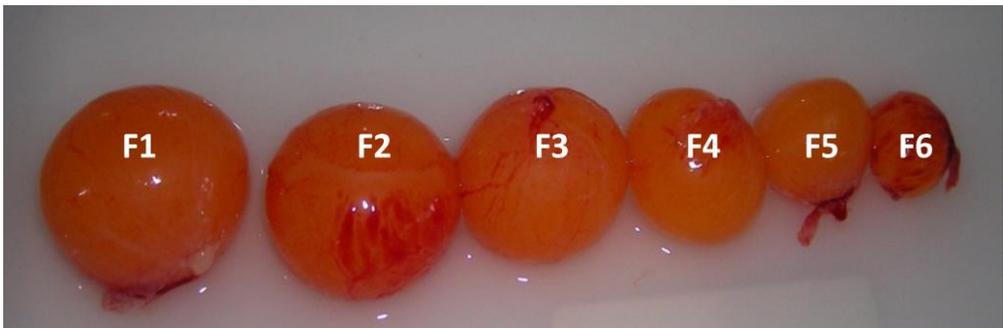
#### 3.2.4.1. Incubación de células de la granulosa

La técnica de separación de la capa granulosa, disgregación celular e incubación con los diferentes preparados de gonadotropinas se llevó a cabo

con ligeras variaciones sobre los métodos descritos en trabajos previos (Hammond *et al.*, 1981; Huang y Nalbandov, 1979; Zakar y Hertelendy, 1980) según se expone a continuación.

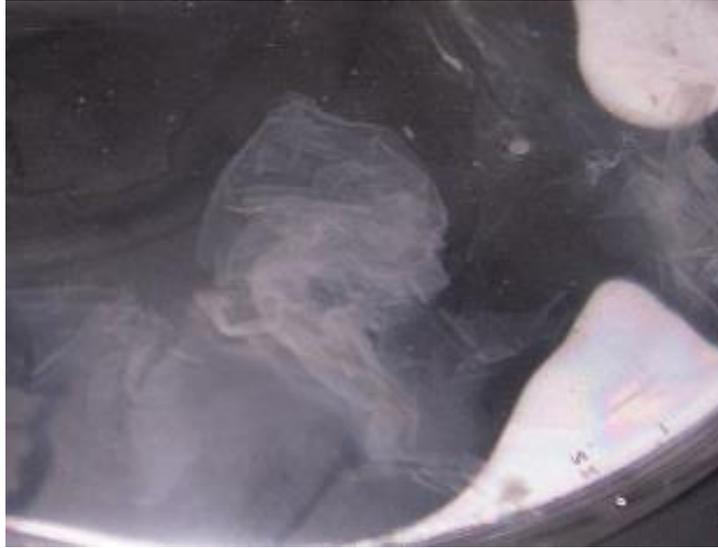
Para la obtención de folículos jerarquizados, se sacrificaron gallinas ponedoras en ciclo de puesta mediante dislocación cervical tras sedación-anestesia con 50 mg/kg de ketamina (Intervet) y 5mg/kg de xilacina (Calier) administrados por vía intramuscular en músculo pectoral.

A continuación, los folículos ováricos se individualizaron mediante sección del pedículo, se depositaron en suero fisiológico a 4°C y se ordenaron por tamaño (F1→F5). Los folículos F1 y F5 se seleccionaron para realizar las posteriores etapas del experimento.



**Ilustración 29. Jerarquía folicular (F1-F6) en gallina ponedora**

Tras incisión con bisturí de la pared folicular en el polo opuesto al pedículo, se dejó fluir el contenido (vitelo) manteniendo el folículo suspendido por el pedículo sobre placa de Petri con suero fisiológico frío. Al finalizar la salida de vitelo, la capa granulosa se desprende espontáneamente del folículo fluyendo al exterior y apreciándose como una membrana semitransparente. Para su identificación es útil colocar un fondo oscuro bajo la placa de Petri.



**Ilustración 30. Capa granulosa recién desprendida de un folículo F1 de gallina**

Las capas de la granulosa así obtenidas fueron sometidas al siguiente proceso:

- Lavados en tubo de ensayo de 50 ml con 30 ml de suero fisiológico a temperatura ambiente para la eliminación del vitelo adherido a la granulosa.
- Digestión enzimática para dispersión celular en medio completo [M199 + Sales de Hank + 10mM HEPES + L-glutamina + L-aminoácidos (GIBCO) + 0,1 mg/ml BSA (Sigma) + Penicilina G (100UI/ml) (GIBCO) + Streptomicina (0.1 mg /ml) (GIBCO)] + 65 mg/ml de colagenasa tipo I (Sigma) ajustado a pH 7,4 durante 10 minutos, a 37°C, con aspiración y eyección cada minuto con jeringa de 1 ml sin aguja. Para la digestión se utilizaron 3 ml de medio para una capa granulosa de folículo F1 o para tres capas de folículos F5.
- Dilución en tres volúmenes del medio completo (sin colagenasa) y centrifugación (600 x g) durante siete minutos. Repetición del proceso tres veces.

- Filtrado (50  $\mu\text{m}$ ) (Becton Dickinson) de la suspensión para eliminación de grumos y agregados celulares, centrifugación (600 x g) durante siete minutos, recuento celular y ajustado de la suspensión a 0,15 x10<sup>6</sup> células/ml en medio completo.
- Evaluación del porcentaje de viabilidad celular mediante tinción con Azul Tripán (Invitrogen). 100  $\mu\text{l}$  de medio de incubación con células de la granulosa se mezclaron con 100  $\mu\text{l}$  de disolución de Azul Tripán al 0,4 % durante un minuto. Las células fueron contadas en cámara de Neubauer. El porcentaje de células viables se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Células viables} = \frac{\text{Células no teñidas}}{\text{Células totales}} \times 100$$

- Distribución en placas de cultivo celular de alícuotas de 300  $\mu\text{l}$  en placas de 24 pocillos (NUNC) en agitación (60 ciclos/minuto) a 37°C.

Las gonadotropinas se añadieron a los pocillos de incubación a concentraciones en el rango de  $\mu\text{g/ml}$ . Las disoluciones de los diferentes preparados de gonadotropinas se añadieron en un volumen de 75  $\mu\text{l}$  por cada mililitro de suspensión celular. En el caso de la suspensión celular utilizada como control negativo se añadió el mismo volumen de medio completo por mililitro de suspensión.

Las incubaciones tuvieron una duración de tres horas. Al final de la incubación, las placas fueron centrifugadas (800 x g, 10') y se recogió el sobrenadante de cada pocillo, conservándose éste a -20°C hasta el análisis de la concentración de progesterona en el medio de incubación.

### **3.2.4.2. Cuantificación de la secreción de progesterona en el medio de incubación.**

Las muestras de las diferentes incubaciones se purificaron mediante extracciones líquido-líquido con acetato de etilo 1:1 (volumen:volumen) y centrifugación, con el fin de recuperar la fracción liposoluble en la fase orgánica.

La cuantificación de la producción de progesterona se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección por espectrometría de masas de triple cuadrupolo (MS-MS, QuattroMicro, Micromass) (Tai *et al.*, 2006).

La técnica HPLC-MS/MS se basa en la combinación de la capacidad de separación física de la cromatografía líquida con la capacidad del análisis de masa de la espectrometría de masas. Es una técnica utilizada en diversas aplicaciones que tiene una elevada sensibilidad y selectividad.

El equipo estuvo constituido por un espectrómetro de masas triple cuadrupolo Quattro Micro (Micromass, Manchester, RU), equipado con una fuente de ionización Z-spray. La introducción de la muestra en el espectrómetro se realizó mediante un sistema de cromatografía líquida de alta eficacia (Shimadzu), formado por una bomba LC-10ADvp, un autoinyector SIL-10ADvp y un controlador SLC-10Avp (Torrance, CA). Para el manejo del equipo y el procesado de los datos se utilizó el programa informático MassLynx 4.1 (Waters corporation, Manchester, UK).

De modo previo a su inyección en el sistema HPLC-MS/MS, las muestras se sometieron a un proceso de purificación mediante extracciones líquido-líquido como se indica a continuación: 300 µl de plasma o de medio de cultivo se extrajeron con 300 µl de acetato de etilo y, tras la centrifugación a 2000 g durante 5 minutos, se recuperó la fase orgánica. Este proceso se repitió dos veces más. Al finalizar el proceso de extracción, los 900 µl de fase

orgánica se desecaron con N<sub>2</sub>. Una vez eliminada la fase orgánica, el resto se disolvió en 300 µL de etanol al 100%. 40 µl de esta solución fueron inyectados directamente en el sistema HPLC-MS/MS.

La separación cromatográfica se realizó en fase reversa utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex Prodigy C18 (Phenomenex), de 100 x 2 mm, con un tamaño de partícula de 3 µm y a temperatura ambiente. Como fase móvil se utilizó un flujo constante de 0.2 ml/min y con el siguiente gradiente, donde la fase A es ácido fórmico al 0.1% y la fase B es metanol (tiempo en minutos/porcentaje de fase A): 0/50; 2/50; 5/5; 10/5; 10.1/50 y 15, 50. Con estas condiciones cromatográficas el tiempo de retención de la progesterona fue de 9,5 minutos.

Las condiciones del espectrómetro de masas fueron las siguientes: Electrospray, negativo; energía del capilar, 3.5 KeV; temperatura de la fuente, 120 °C; gas de secado y nebulización, nitrógeno (flujo: 300 y 30 l/h) y gas de colisión, argón (1.5x10<sup>-3</sup> mbar). La máxima señal analítica para la progesterona se obtuvo en la transición 315,2-109 con una energía del cono de 35 V y una energía de colisión de 25 V.

La cuantificación de la progesterona en las muestras se realizó inyectando en el espectrómetro una batería de concentraciones conocidas entre 0,01 ng/ml y 50 ng/ml en EtOH 100%. En todos los casos el coeficiente de correlación fue superior a 0,99.

### **3.2.5. Administración de los tratamientos *in vivo*.**

La administración de los tratamientos se realizó por vía intramuscular en músculo pectoral mediante inyección con jeringa de 1 ml y aguja 28G.

### **3.2.6. Necropsia y medición de folículos ováricos y oviducto.**

El sacrificio de los animales tratados previo a necropsia se llevó a cabo mediante inyección intrapulmonar de 200 mg de embutramida + 50 mg de yoduro de mebezonio + 5 mg de hidrocloreto de tetracaína (T-61, Merck Sharp & Dohme Animal Health), previa anestesia con ketamina/xilacina.

En la necropsia, se practicó la disección y exéresis del ovario y del oviducto y se procedió a su fijación en formol al 4%. El peso del ovario y la medición del diámetro de los folículos se llevó a cabo tras la fijación, dado que el endurecimiento de la estructura folicular facilita la medición sin que se produzcan cambios significativos con respecto a la medición de los folículos en fresco (Gilbert et al., 1983). La toma de medidas se realizó mediante pie de rey. En el caso de los folículos de tamaño inferior a dos milímetros, la medición se realizó bajo visualización con lupa (4X) del ovario.

Los oviductos se obtuvieron mediante disección desde el infundíbulo hasta la unión uterovaginal.

### **3.2.7. Ecografía**

En las exploraciones ecográficas se utilizó un ecógrafo portátil (Viamo SSA-640A, Toshiba) con sonda de tipo lineal y frecuencia variable de 6,2 a 11 MHz (PLT-704ST, Toshiba).

Tras la aplicación de gel para transmisión de ultrasonidos (Aquasonic, Parker) la sonda se colocó en la región subcostal izquierda con leve presión y se orientó en diferentes ángulos de giro para el barrido ecográfico de la región ovárica en busca de estructuras foliculares o de huevos en formación en el oviducto. La medición de los folículos se realizó mediante cursores

electrónicos e identificando la línea de pared folicular de los folículos de aspecto circular en su diámetro máximo. En el caso de folículos preovulatorios resultó habitual encontrar estas estructuras con ligeras deformaciones de su estructura circular; ante esta circunstancia se realizaron dos mediciones y se consideró la media de ambas.

Dado que la presencia de plumas (reellenas de aire) dificulta la transmisión de los ultrasonidos, previamente a la práctica de las exploraciones ecográficas se procedió a la eliminación por tracción de las plumas en un área de 2 cm<sup>2</sup> de la piel en la región subcostal izquierda. La exploración ecográfica no requirió la aplicación de anestesia o sedación.

### **3.2.8. Inseminación artificial.**

La obtención de esperma e inseminación artificial en palomas se realizó según protocolos descritos (Cheng *et al.*, 2002; Sontakke *et al.*, 2004). En resumen, se realizó masaje abdominal inferior en sentido cráneo-caudal y se exprimió suavemente la cloaca en este mismo sentido con los dedos pulgar e índice del operador. El esperma fluyente se recogió en tubos capilares de hematocrito de 70 mm de longitud y 1,15 mm de diámetro interno (7411 Deltalab).



**Ilustración 31. Espermatozoides de paloma bravía tras dilución 1:40 en suero fisiológico**

La inseminación intraoviductal o intracloacal se llevó a cabo con volúmenes entre 2-24  $\mu$ l. Para la visualización del oviducto, se aplicó manualmente presión suave sobre la región suprapúbica izquierda. Simultáneamente, mediante dos separadores (construidos con alambre), se separaron los pliegues cloacales para facilitar la visualización del oviducto.

### **3.2.9. Incubación.**

Los huevos puestos mediante inducción hormonal del ciclo en paloma fueron incubados artificialmente en incubadora R-Com 20 (Rcom CMPNY, Canadá). Los huevos se incubaron a 37,5°C con 50% de humedad relativa los primeros 15 días y 70 % los días restantes. Los huevos se mantuvieron en incubación un máximo de 21 días.

El volteo automático cada 4 horas se mantuvo hasta el día once de incubación.

La ovoscopia se realizó mediante ovoscopio portátil de bombilla de diodo emisor de luz -LED- (Copele).

### **3.2.10. Mantenimiento de los pichones**

Tras la eclosión, los pichones fueron alimentados artificialmente con suero glucosado al 5% (Vitulia) durante las primeras 24 horas. Se administraron 200  $\mu$ l cada 2 h por vía digestiva (intraesofágica) mediante jeringa de 1 ml y catéter intravenoso 22G (Becton Dickinson (BD), EEUU). Desde el 2º hasta el 8º día, se añadió al suero polvo de leche de arroz (Blemil Plus Arroz, Ordesa) en concentraciones crecientes. La concentración inicial fue de 1g/10 ml. La concentración final (4g/10ml) se mantuvo del 5º al 8º día. Se administraron 300  $\mu$ l de esta solución cada 3 h los días 2º-5º, y cada 4 h (400  $\mu$ l) los días 5º-8º. Posteriormente, se añadió a la solución un triturado de semillas hervidas previamente durante una hora (semillas habitualmente utilizadas en la alimentación de las palomas adultas en nuestros ensayos). Este alimento se proporcionó mediante una jeringuilla a la que se acopló en su cono una tetina de biberón recortada de modo que el pichón pudiera introducir el pico y succionar dentro de la cavidad resultante. Los primeros diez días tras la eclosión, los pichones fueron mantenidos en la incubadora a 37°C, los seis días siguientes a 30°C y tres días a 26°C antes de su paso a temperatura ambiente.

### **3.2.11. Sexado molecular de aves**

El sexo de las aves está determinado cromosómicamente. En especies aviares, las hembras son heterogaméticas (ZW), mientras los machos son homogaméticos (ZZ). Tanto en el cromosoma Z como en el W se encuentran los genes codificantes de la cromosoma helicasa de unión a ADN (CHD). Sin

embargo, existen diferencias en el número de nucleótidos en determinados intrones de estos genes según se encuentren en el cromosoma Z (CDH-Z) o el cromosoma W (CDH-W) (Griffiths *et al.*, 1998). La amplificación de estos intrones mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), proporciona dos productos de diferente tamaño molecular que, al ser separados mediante electroforesis, permiten determinar la existencia o no del gen Z. De este modo, en la electroforesis en gel de agarosa aparecerán dos bandas en el caso del sexo femenino y una sola banda en el sexo masculino (Fridolfsson *et al.*, 1999).

Las muestras de ADN se extrajeron a partir de plumas en las palomas adultas y de fragmentos de 1 - 2 mm<sup>2</sup> de membrana corioalantoidea adherida al huevo tras la eclosión los pichones y embriones obtenidos en los trabajos objeto de esta tesis.

La obtención del ADN molde se realizó mediante el kit REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se procedió del siguiente modo:

1. Descongelación de los reactivos.
2. Dispensación de 100 µl de Solución de Extracción en un tubo Eppendorf de 1,5 ml para cada muestra.
3. Adición de 25 µl de Solución de Preparación de Tejidos a cada tubo Eppendorf. Mezclado por pipeteo.
4. Adición de la muestra a cada tubo.
5. Incubación de las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos.
6. Incubación de las muestras a 95°C durante 3 minutos en termobloque.
7. Al terminar la incubación anterior, adición de 100 µl de la Solución de Neutralización a cada muestra. Mezclado en vórtex.
8. Utilización de las muestras para la amplificación de forma inmediata o almacenamiento a 4°.

Los cebadores utilizados en la reacción de PCR fueron los denominados 2550F y 2718R (Fridolfsson y Ellegren, 1999):

- 2550F (5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3')
- 2718R (5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3')

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando la mezcla comercial REExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma) a la que se añadieron los cebadores y el ADN molde. La mezcla final en cada tubo Eppendorf de microcentrífuga se describe en la siguiente tabla:

**Tabla 13. Mezcla de PCR para sexado molecular de aves**

Componente	Volumen	Concentración Final
Agua libre de nucleasas (Sigma)	5,9 µL	---
Mezcla REExtract-N-Amp Tissue PCR Kit	10 µl	---
Cebador 2550F	0,05 µl	0,4 µM
Cebador 2718R	0,05 µl	0,4 µM
DNA molde	4 µl	---
Volumen total	20 µl	

La reacción se realizó en Termociclador Techne TC-312 programado para la ejecución de los siguientes ciclos térmicos y con tapadera calefactada a 104°C.

**Tabla 14. Programación termociclador PCR para sexado molecular**

Nº Ciclos	Tiempo	Temperatura
1	2'	94°C
1	30''	55°C
1	1'	72°C

34	30''	92°C
	30''	50 °C
	45''	72°C
1	5'	72°C

Finalizada la reacción, el contenido de cada microtubo se cargó en gel de agarosa (Sigma) al 2% en tampón tris-acetato-EDTA pH: 8,3 (TAE 1X) (Sigma) y se practicó la separación de las moléculas de ADN en cubeta de electroforesis con TAE 1X a 70 V durante 45 minutos.

Una vez finalizada la separación, se visualizó el gel en transiluminador de luz ultravioleta ECX-20M (Labolan) para identificación visual de los fragmentos de ADN obtenidos por PCR.

### 3.2.12. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa Microsoft Excel (2010). Se aplicó en todos los casos el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) seguido de test de Tukey para el análisis de los resultados obtenidos. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron a partir del  $p$  valor especificado en cada análisis.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 4.1. ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO* DE CCRFSH, TPE, LH IEX Y ECG

Con el objeto de valorar la actividad biológica de la FSH recombinante de codorniz (ccrFSH) obtenida con la metodología descrita anteriormente, se realizó un ensayo *in vitro* que determinara tanto dicha actividad como su especificidad de modo previo a su utilización *in vivo*. Este ensayo se basó en la capacidad de la FSH de inducir la secreción de progesterona en células de la granulosa de folículos preovulatorios de gallina.

Además, dada la ausencia de una LH recombinante para el tratamiento combinado (FSH/LH) *in vivo*, que pudiera ser necesario en la inducción del ciclo ovárico completo en aves, fue considerado indispensable valorar la actividad *in vitro* de los preparados hormonales con supuesta actividad LH obtenidos previamente y mediante adquisición de un preparado comercial veterinario (Foligon®, Intervet). Los preparados hormonales sometidos a ensayo *in vitro* fueron: ccrFSH, extracto glicoproteico de adenohipófisis de pavo (EGP), LH obtenida por semipurificación en cromatografía de intercambio iónico (LH IEX) a partir de EGP y Foligon® (gonadotropina coriónica equina, eCG).

FSH y LH activan receptores celulares diferentes y específicos en aves y desarrollan diferentes funciones biológicas a lo largo del ciclo ovárico (A. L. Johnson, 2014). Las células de la granulosa de los folículos preovulatorios aviares poseen capacidad esteroideogénica (síntesis y secreción de progesterona) y responden de modo diferencial al estímulo gonadotropo FSH o LH en función de su pertenencia a folículos preovulatorios con mayor o menor grado de madurez. En ensayos *in vitro*, las células de la granulosa de los folículos de gallina más maduros (F1) incrementan la secreción de progesterona al ser incubadas en presencia de LH, pero no en presencia de FSH. De modo inverso, las células provenientes de folículos preovulatorios

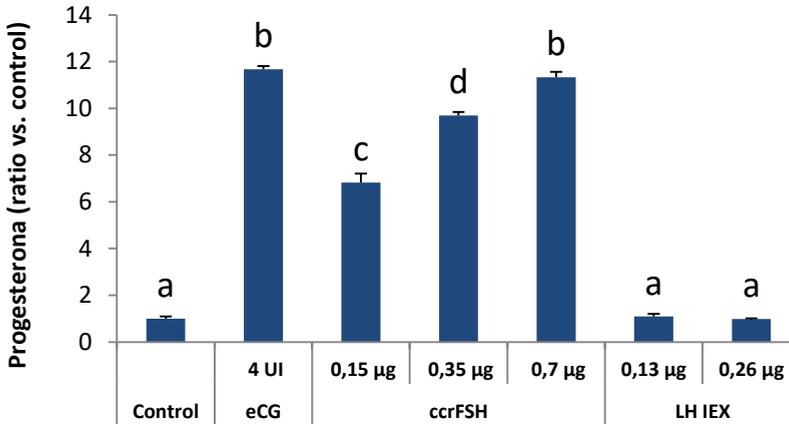
más inmaduros (F5), incrementan la secreción de progesterona al ser incubadas en presencia de FSH, pero no de LH (Hammond *et al.*, 1981; A. L. Johnson y Lee, 2016).

Se realizaron pruebas preliminares para determinar las mejores condiciones de aislamiento de la capa granulosa de los folículos ováricos, el tratamiento enzimático para la dispersión de sus células y la evaluación de su viabilidad mediante tinción por exclusión con Azul Tripán (descrito en Material y Métodos). El porcentaje de células viables tras el proceso de disgregación e inmediatamente antes de los ensayos fue  $\geq 95\%$ .

La gonadotropina coriónica equina (eCG o PMSG) posee doble actividad gonadotropa (FSH y LH) en aves (Armstrong, 1994; Wells *et al.*, 1985), así como en mamíferos (Hoppen, 1994). Por este motivo, la eCG se utilizó en los ensayos *in vitro* como control positivo para comprobar tanto la integridad de los receptores FSHR y LHR como la capacidad de respuesta secretora de progesterona de las células de la granulosa tras el proceso de disgregación celular en incubación bajo estímulo gonadotropo. En los experimentos preliminares se determinaron las concentraciones (eCG) y tiempos óptimos para el ensayo, resultando en 4 UI/ml y 3 horas de incubación respectivamente, tanto para F1 como F5.

Tras el aislamiento de células de la granulosa de folículos F1 y F5 de gallina, se procedió a su incubación en presencia de diferentes concentraciones de los siguientes preparados hormonales:

- ccrFSH (0,15-1 $\mu$ g/ml)
- LH IEX (0,13-0,26  $\mu$ g/ml)
- eCG (4 UI/ml)
- EGP (1,6-3,1  $\mu$ g/ml)



**Figura 4. Secreción de progesterona por células de la granulosa F5 tras incubación con gonadotropinas**

Secreción de progesterona por células de la granulosa ( $0,15 \times 10^6$  células/ml) de folículos F5 de gallina incubadas durante tres horas con diferentes concentraciones de ccrFSH, LH IEX y eCG o sin estímulo gonadotropo (Control). Las columnas representan la media + DS de cada grupo de tratamiento. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA seguido de test de Tukey;  $p \leq 0,001$ ;  $n = 3$  réplicas por punto). Concentración de progesterona en Control =  $13 \pm 1$  ng/ml

En la Figura 4 se representa el múltiplo (*fold change*) de concentración de progesterona en el medio de incubación con respecto a la concentración del Control (sin estímulo gonadotropo). El valor de Control se establece en 1 y es equivalente a la media de las concentraciones de los diferentes puntos de este grupo. El múltiplo con respecto a este valor fue el cociente resultante de dividir la media de cada uno de los grupos entre la media del grupo control. Esta operación se utilizó también en la representación de datos del experimento siguiente con células de folículos F1 (Figura 5).

ccrFSH indujo la secreción de progesterona a concentraciones de 0,15; 0,35 y 0,7 µg/ml. Además, la secreción de progesterona resultó dependiente

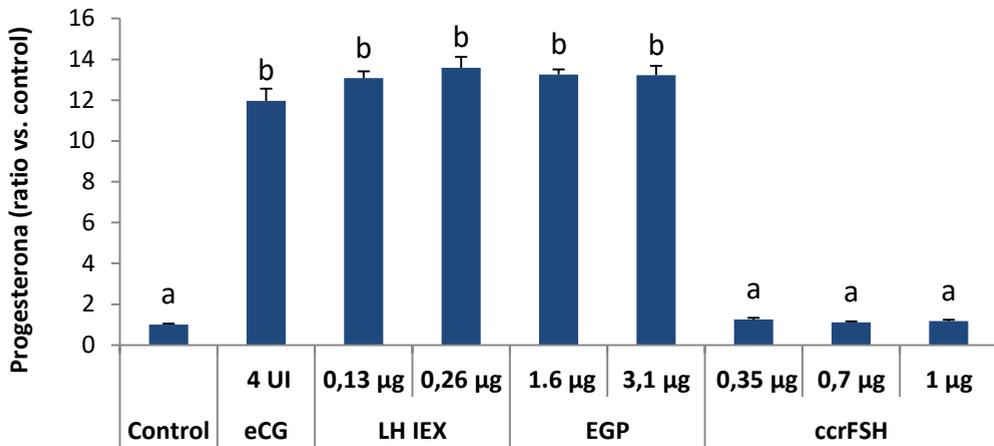
de la concentración de ccrFSH. La máxima concentración de ccrFSH indujo un incremento de 11,3 veces en la concentración de progesterona en el medio con respecto a Control.

En estudios realizados previamente, la concentración de FSH utilizada para la obtención de respuesta en este tipo de ensayos fue de 2 µg/ml (Hammond *et al.*, 1981). En nuestras condiciones, la concentración de ccrFSH capaz de inducir respuesta máxima fue inferior a la citada. La razón de esta eficacia a menor concentración puede deberse a la contaminación por otras proteínas en la FSH utilizada por Hammond *et al.*, así como a la naturaleza de esta FSH (FSH de pavo) o a la diferente estabilidad de ambas hormonas en el medio de cultivo entre otras posibles causas.

eCG indujo un incremento en la secreción de progesterona, como era predecible, por su actividad FSH en aves. La secreción de progesterona inducida por ccrFSH a 0,7 µg/ml fue igual a la secreción inducida por eCG a 4 UI/ml ( $p < 0,001$ ).

La fracción semipurificada de LH (LH IEX) de adenohipófisis de pavo no indujo la secreción de progesterona en células pertenecientes a F5, lo que sugiere que la posible presencia de FSH contaminante en esta fracción es insuficiente para inducir respuesta esteroidogénica en las células de F5 en nuestras condiciones de ensayo *in vitro*. Además, la incubación con anti-β-FSH de esta fracción no produjo señal en *Western blotting* en los ensayos realizados tras el proceso cromatográfico de purificación.

Para la valoración de la actividad LH de los preparados gonadotropos disponibles, se llevó a cabo la incubación de células de la granulosa F1 con diferentes concentraciones de los mismos.



**Figura 5. Secreción de progesterona por células de la granulosa F1 tras incubación con gonadotropinas**

Secreción de progesterona por células de la granulosa ( $0,15 \times 10^6$  células/ml) de folículos F1 de gallina incubadas durante tres horas con diferentes concentraciones de eCG, LH IEX, EGP y ccrFSH o sin estímulo gonadotropo (Control). Las columnas representan la media + DS de cada grupo de tratamiento. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA seguido de test de Tukey;  $p \leq 0,001$ ;  $n = 3$  réplicas por punto). Concentración de progesterona en Control =  $15,75 \pm 0,68$  ng/ml.

Tanto la fracción LH IEX como el extracto glicoproteico de adenohipófisis de pavo (EGP) incrementaron significativamente la secreción de progesterona en células de la granulosa de folículos F1 (Figura 5). Estos resultados demuestran que tanto EGP como LH IEX conservan actividad LH tras los procesos de extracción de la fracción glicoproteica a partir de adenohipófisis de pavo y la subsiguiente semipurificación por intercambio iónico descritos en el apartado "Purificación de hormonas hipofisarias".

eCG, también indujo el incremento en la secreción de progesterona en este ensayo, poniendo de manifiesto su capacidad para activar los receptores LH en aves, mientras ccrFSH no incrementó la secreción de progesterona en este ensayo ni siquiera a concentraciones superiores ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) a las que

indujeron respuesta máxima en el ensayo anterior en células de folículos F5. La concentración de progesterona en el medio de las células incubadas con ccrFSH fue igual a la de las células del control negativo. Este resultado sugiere que ccrFSH activa específicamente los receptores FSHR y no los LHR en estas condiciones experimentales.

En resumen, los resultados de estos ensayos *in vitro* fueron:

- ccrFSH, induce la secreción de progesterona en las células de la granulosa de folículos F5, pero no de F1. De ello se deduce que ccrFSH tiene actividad específica FSH y carece de actividad LH en las células de la granulosa de gallina en nuestras condiciones experimentales
- LH IEX posee actividad específica LH, pero carece de actividad FSH a las concentraciones utilizadas
- EGP posee actividad LH. La actividad FSH no fue determinada
- eCG posee actividad FSH y LH en aves tal como consta en anteriores trabajos

## 4.2. EFECTO BIOLÓGICO DE CCRFSH *IN VIVO* EN CODORNIZ

Con el fin de valorar la actividad biológica *in vivo* de ccrFSH en codorniz común, se procedió a la administración parenteral de diferentes dosis de esta gonadotropina a codornices jóvenes en estado de inactividad reproductiva.

Las dosis administradas fueron calculadas teniendo en cuenta las dosis efectivas en inducción de la espermatogénesis en machos de esta especie durante experimentos previos que no son objeto de esta tesis. En estos experimentos, las dosis de 0,4 y 0,6 µg/día fueron eficaces en la inducción de la espermatogénesis en machos de 40 días sometidos a fotoperiodo corto. Dosis inferiores no indujeron cambios significativos respecto a Control.

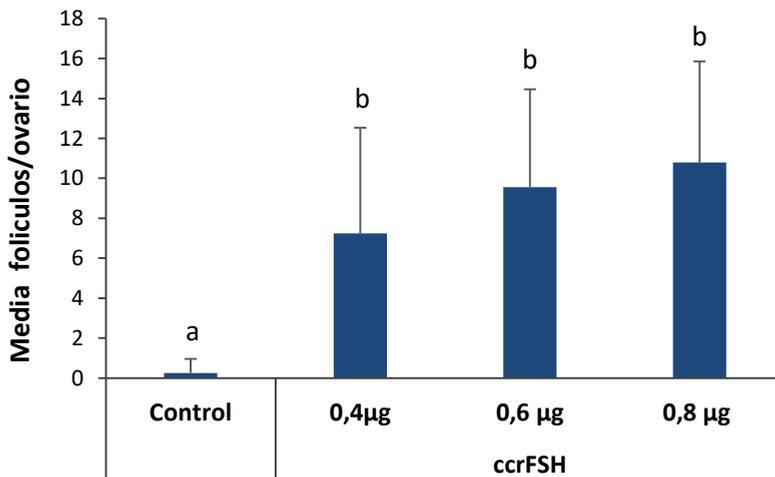
Los animales experimentales fueron hembras de codorniz común de 42 días de edad, alimentadas *ad libitum* y mantenidas en fotoperiodo corto de 8 horas de luz y 16 de oscuridad diarias (8L:16O). En estas condiciones, las codornices permanecen en estado prepuberal sin desarrollo ovárico ni oviductal (Wakabayashi *et al.*, 1992).

Se establecieron cuatro grupos de individuos experimentales que recibieron diferentes tratamientos:

- Grupo 1 (n=9): Control. 200 µl de suero fisiológico.
- Grupo 2 (n=8): 0,4 µg de ccrFSH.
- Grupo 3 (n=7): 0,6 µg de ccrFSH.
- Grupo 4 (n=10): 0,8 µg de ccrFSH.

Estas dosis se administraron durante 15 días cada 24 horas por vía intramuscular en músculo pectoral y en volumen de 200 µl. Los volúmenes a inyectar se ajustaron a 200 µl con suero fisiológico en cada grupo tratado con ccrFSH.

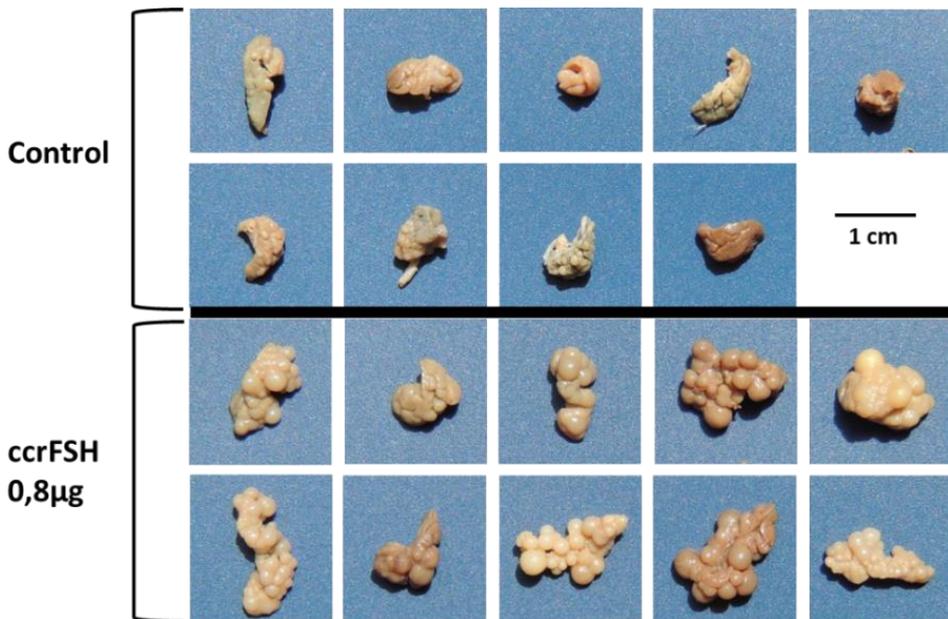
Veinticuatro horas tras la 15ª dosis, se practicó el sacrificio y necropsia y se realizó la exéresis ovárica y oviductal. Posteriormente, se midió y contó el total de folículos de diámetro  $\geq 1$  mm en cada individuo. La elección de estos folículos como parámetro de estudio estuvo fundamentada en su consideración de folículos en fase de crecimiento lento o prejerárquico en gallina y codorniz japonesa y, en general, en aves (A. L. Johnson, 2015; A. L. Johnson y Lee, 2016; Hrabia, Ha, y Shimada, 2004; Sreesujatha *et al.*, 2016). Además, el papel de la FSH en el desarrollo inicial y la maduración de los folículos ováricos en vertebrados está ampliamente aceptado (Woods y Johnson, 2005).



**Figura 6. Folículos ováricos  $\geq 1$  mm tras tratamiento con ccrFSH en codorniz**

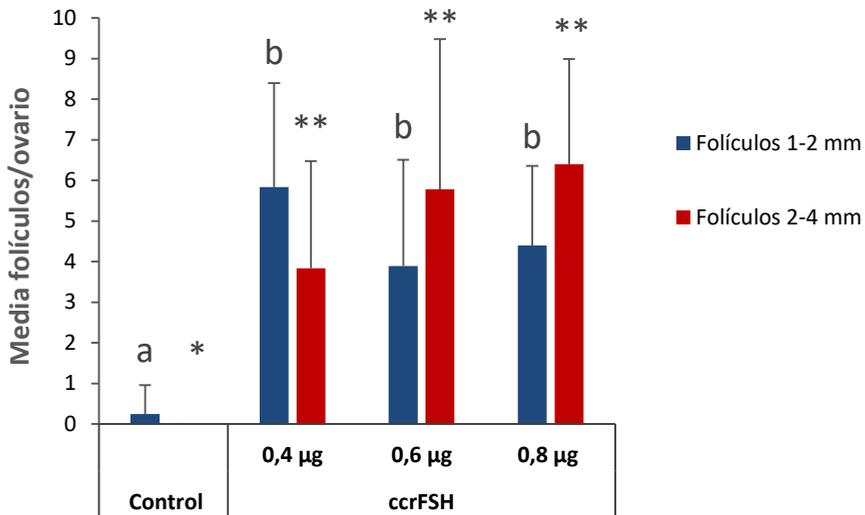
Administración de diferentes dosis de ccrFSH cada 24 h durante 15 días en codornices hembra. Edad: 42 días. Fotoperiodo: (8L:16O). Las columnas representan la media + DS del número de folículos ováricos por individuo de diámetro  $\geq 1$  mm para cada grupo de tratamiento. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA seguido de test de Tukey;  $p \leq 0,001$ ).

El número de folículos de diámetro  $\geq 1$  mm fue superior en los tres grupos tratados con ccrFSH respecto al grupo Control (Figura 6). Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre los grupos tratados con diferentes dosis de ccrFSH a pesar de apreciarse una tendencia al mayor recuento de estos folículos en relación dosis dependiente.



**Ilustración 32. Aspecto macroscópico de los ovarios de las codornices de los grupos Control y tratadas con ccrFSH (0,8 µg)**

Administración de 0,8 µg de ccrFSH cada 24 h durante 15 días en codorniz hembra. Edad: 42 días. Fotoperiodo: 8L:16O.



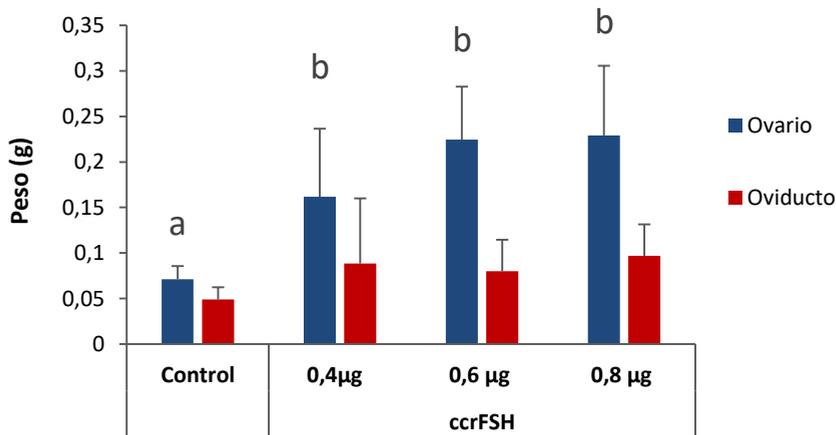
**Figura 7. Folículos ováricos en categorías de 1-2 mm y 2-4 mm tras tratamiento con ccrFSH**

Administración de diferentes dosis de ccrFSH cada 24 h durante 15 días en codornices hembra. Edad: 42 días. Fotoperiodo: 8L:16O. Las columnas representan la media + DS del número de folículos ováricos por individuo cada grupo de tratamiento. Diferentes letras o símbolos indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA seguido de Tukey;  $p \leq 0,001$ ).

Al establecer el recuento folicular en categorías por diámetro 1-2 y 2-4 mm, las diferencias entre los grupos tratados con ccrFSH no fueron significativas, pero sí se apreció un mayor número de folículos de 2-4 mm en los grupos tratados con dosis superiores (Figura 7). No se encontraron folículos de diámetro  $\geq 4$  mm en ninguno de los individuos.

El peso ovárico, directamente relacionado con el desarrollo folicular en aves (Henare *et al.*, 2012), fue significativamente superior en los grupos que recibieron ccrFSH con respecto al Control, sin embargo, las diferencias no fueron significativas entre los grupos tratados con diferentes dosis de esta

hormona. El peso oviductal fue igual en todos los grupos, incluido el Control (Figura 8).



**Figura 8. Peso ovárico y oviductal tras tratamiento con ccrFSH**

Administración de diferentes dosis de ccrFSH cada 24 h durante 15 días en codornices hembra. Edad: 42 días. Fotoperiodo: 8L:16O. Las columnas representan la media + DS de cada grupo de tratamiento. Diferentes letras o símbolos indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA seguido de Tukey;  $p \leq 0,001$ ).

En las codornices comunes en ciclo de puesta espontáneo utilizadas como ponedoras para la cría de individuos experimentales en nuestros trabajos, el diámetro folicular mínimo de los folículos pequeños amarillos (SYF) identificados como tales por su aspecto macroscópico fue de 3,4 mm, mientras que los folículos jerárquicos tuvieron siempre un diámetro  $\geq 5$  mm. En este ensayo, se hallaron un total de seis SYF, cuatro en el grupo tratado con 0,8 µg de ccrFSH (3,92; 3,88; 3,68 y 3,63 mm) y dos en el grupo tratado con 0,6 µg (3,80 y 3,42). No se encontraron folículos de diámetro  $\geq 5$  m. Por

tanto, no se indujo el desarrollo de folículos jerárquicos mediante la administración de ccrFSH.

En aves, la evolución de un folículo prejerárquico a la fase de crecimiento rápido (jerárquico) es debida a la acumulación masiva de vitelo ovocitario, cuya masa sólida está compuesta fundamentalmente por vitelogenina y VLDL. Ambas lipoproteínas se sintetizan en el parénquima hepático bajo estímulo estrogénico (Bujo *et al.*, 1994; Deeley *et al.*, 1977; A. L. Johnson, 2014; Ratna *et al.*, 2016). Por tanto, la ausencia de acumulación de vitelo en los ovocitos en las codornices tratadas exclusivamente con ccrFSH podría deberse a la ausencia de síntesis hepática de vitelogenina y VLDL por insuficiente estímulo estrogénico.

La ausencia de desarrollo oviductal observada en este experimento, también podría ser atribuida a la ausencia de estímulo estrogénico, dado que el desarrollo y crecimiento de esta estructura es dependiente de la exposición a estradiol (Dougherty y Sanders, 2005; Hrabia *et al.*, 2014).

Palmer y Bahr (1992) administraron FSH de origen porcino a gallinas ponedoras de 80 semanas de edad (“viejas”). Estos animales presentan un menor número de folículos blancos grandes (LWF) y folículos amarillos pequeños (SYF), y mayor número de folículos atrésicos que las gallinas jóvenes. La administración de dosis subcutáneas diarias (cinco días) de 12.5, 50, 200 y 400 µg indujo un aumento en el número de LWF y SYF y una reducción del número de folículos atrésicos junto a un incremento en las concentraciones plasmáticas de estradiol en relación dosis dependiente (Palmer & Bahr, 1992). La principal fuente de estradiol en gallina son los folículos de 1-8 mm (SWF, LWF y SYF), sin embargo, es la actividad LH (y no la FSH) la que posee la actividad esteroideogénica (secreción de androstendiona y estradiol) sobre estos folículos (Robinson y Etches, 1986; Robinson *et al.*, 1988). Dado que el experimento de Palmer y Bahr se realizó en gallinas en ciclo de puesta con concentraciones de LH típicas de este

estado reproductivo (al inicio del experimento), se puede deducir como probable que la FSH promoviera el desarrollo de LWF y SYF, y que la actividad LH endógena, al actuar sobre estos folículos, fuera la responsable del incremento de estradiol plasmático. Sin embargo, no se han encontrado referencias bibliográficas de trabajos realizados por otros autores en relación a la administración aislada de FSH en aves reproductivamente inmaduras cuyos resultados pudieran ser comparados con los de nuestros ensayos.

Además, la administración de preparados obtenidos a partir de adenohipófisis de pollo con actividad FSH/LH durante dos semanas, sí induce el desarrollo folicular y oviductal completo (Mitchell, 1967b; Taber *et al.*, 1958; Wakabayashi *et al.*, 1992).

Por tanto, se hipotetizó que, en el presente ensayo, la ausencia de desarrollo folicular más allá del estadio de folículo SYF tras tratamiento exclusivo con ccrFSH podría deberse, probablemente, al déficit de LH.

Por otro lado, en este ensayo, los escasos folículos desarrollados hasta SYF se dieron en los grupos tratados con las dos dosis más altas de ccrFSH (0,6 y 0,8  $\mu\text{g}$ ). Este hecho sugirió la posibilidad de que dosis superiores de ccrFSH pudieran inducir un desarrollo folicular más avanzado que el observado con las dosis empleadas.

Por estos motivos, en el siguiente experimento se procedió a la administración de una dosis superior de ccrFSH (1 $\mu\text{g}$ /24h) y de ccrFSH y LH IEX de forma combinada.

En resumen, los resultados de este ensayo *in vivo* fueron los siguientes:

- La administración intramuscular diaria (0,4-0,8 $\mu\text{g}$ ) de ccrFSH induce el desarrollo de folículos ováricos prejerárquicos de 1-4 mm de diámetro pero no de folículos preovulatorios en codorniz prepúber.
- Este protocolo no induce la secreción de estradiol necesaria para el desarrollo oviductal.

### 4.3. EFECTO BIOLÓGICO DEL TRATAMIENTO COMBINADO CON ccrFSH Y LH IEX *IN VIVO* EN CODORNIZ

En el presente experimento se ensayó la administración de una dosis superior de ccrFSH (1 $\mu$ g/24h) y de la fracción LH IEX de forma aislada y la combinación.

Se utilizaron dos dosis diferentes de LH IEX: 17 y 34  $\mu$ g/día. Estas dosis fueron equivalentes al rendimiento en purificación de 1,5 y 3 adenohipófisis de pavo a partir de su extracto glicoproteico, y son comparables (salvo diferencias en purificación y especie) a las que resultaron eficaces en la inducción de desarrollo folicular completo en experimentos realizados por otros grupos (Taber *et al.*, 1958; Wakabayashi *et al.*, 1992).

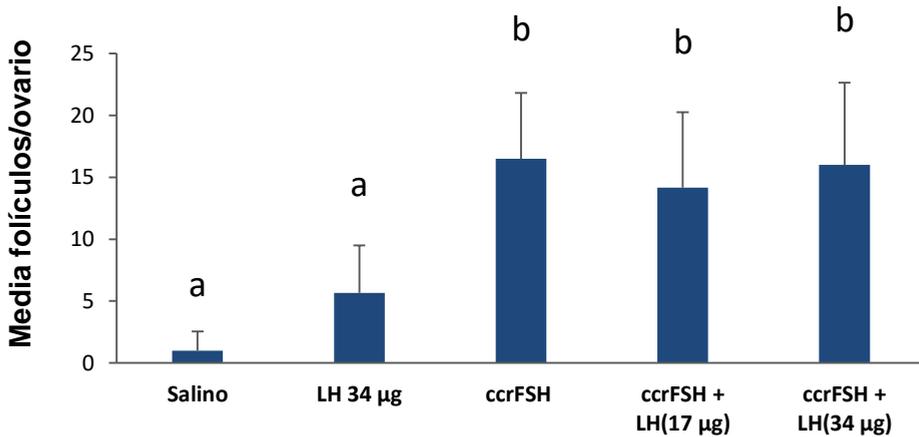
Los individuos objeto del ensayo fueron hembras de codorniz común en condiciones idénticas a las del experimento anterior.

Se establecieron cinco grupos experimentales que recibieron los siguientes tratamientos:

- Grupo 1 (n=6): Control: 200  $\mu$ l suero fisiológico
- Grupo 2 (n=6): ccrFSH (1  $\mu$ g)
- Grupo 3 (n=6): LH IEX (34  $\mu$ g)
- Grupo 4 (n=6): ccrFSH (1  $\mu$ g) + LH IEX (17  $\mu$ g)
- Grupo 5 (n=5) : ccrFSH (1  $\mu$ g) + LH IEX (34  $\mu$ g)

Los tratamientos se administraron por vía intramuscular cada 24 horas. Los volúmenes de inyección se completaron hasta 200  $\mu$ l con suero fisiológico añadido a cada preparado hormonal. La duración del tratamiento fue de 15 días.

Como en el anterior experimento, 24 horas tras la última administración hormonal se realizó la medición y recuento de los folículos ováricos de diámetro  $\geq 1$  mm, y se pesó el ovario y el oviducto.



**Figura 9. Folículos ováricos de diámetro  $\geq 1$  mm tras tratamiento con ccrFSH y LH IEX**

Administración en codornices hembra de ccrFSH (1 µg) sola o en combinación con dos dosis de LH IEX (17 y 34 µg) y 34 µg de LH IEX sola cada 24 h durante 15 días. Edad: 42 días. Fotoperiodo: 8L:16O. Las columnas representan la media + DS del número de folículos por individuo para cada grupo de tratamiento. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA seguido de test de Tukey;  $p \leq 0,001$ ).

La media de folículos ováricos de diámetro  $\geq 1$  mm fue superior en los grupos que recibieron tratamiento con ccrFSH y ccrFSH/LH IEX que en el grupo que recibió LH IEX exclusivamente y en Control (Figura 9). Sin embargo, no hubo diferencias significativas con respecto a este parámetro entre los grupos que recibieron tratamiento con ccrFSH con o sin LH IEX. Aunque la media de folículos por ovario fue superior en el grupo tratado

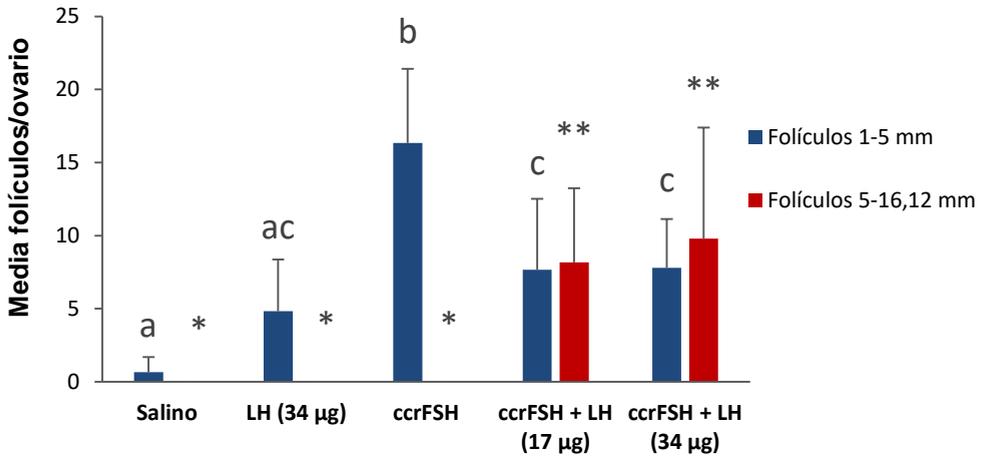
con LH IEX respecto a Control, la diferencia no fue estadísticamente significativa.



**Ilustración 33. Aspecto macroscópico de los ovarios de los individuos tratados con ccrFSH o LH IEX de forma aislada y grupo Control**

Sólo en los grupos tratados con la combinación ccrFSH/LH IEX los folículos ováricos experimentaron crecimiento superior a 5 mm de diámetro (Figura 10). Este diámetro no se alcanzó en ningún caso en los grupos tratados sólo con ccrFSH o LH IEX y Control. En el grupo tratado con ccrFSH exclusivamente, el diámetro folicular máximo superó los 4 mm (SYF) en ocho folículos en un individuo y en dos en otro. En el grupo tratado con LH IEX, el tamaño folicular máximo registrado fue de 2,83 mm.

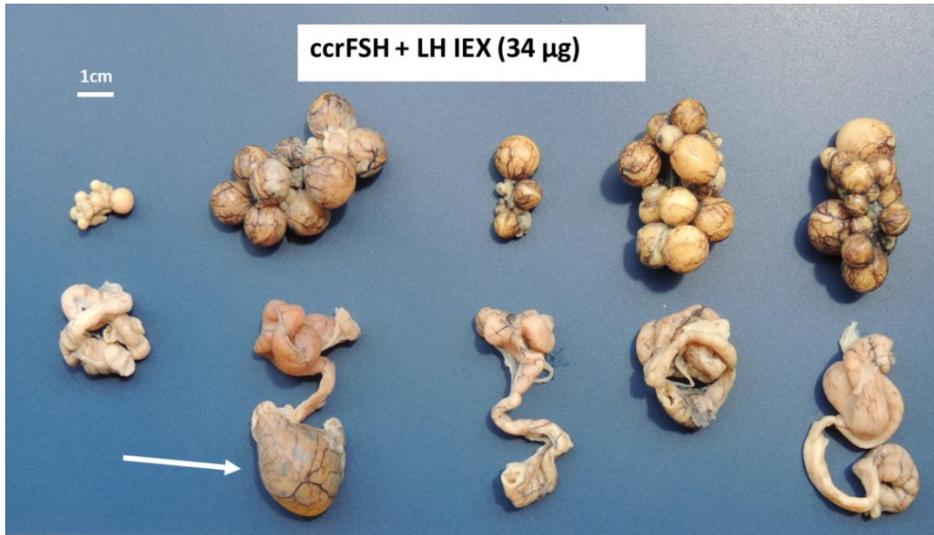
Como se comentó anteriormente, en nuestras codornices en ciclo de puesta espontáneo el diámetro (observación propia) en los folículos jerárquicos (preovulatorios) fue siempre  $\geq 5$  mm. Por este motivo, se establecieron dos categorías en el recuento folicular: 1-5 mm (folículos prejerárquicos: SWF, LWF y SYF) y 5-16,12 mm (folículos jerárquicos/preovulatorios).



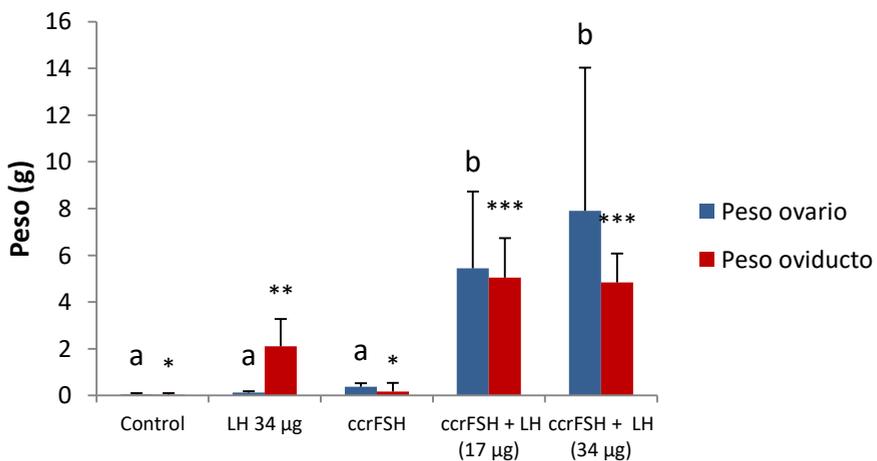
**Figura 10. Folículos ováricos agrupados por categorías según diámetro folicular tras tratamiento con ccrFSH y LH IEX**

Administración en codornices hembra de ccrFSH (1 µg) sola o en combinación con dos dosis de LH IEX (17 y 34 µg) y 34 µg de LH IEX sola cada 24 h durante 15 días. Edad: 42 días. Fotoperiodo: 8L:16O. Las columnas representan la media + DS del número de folículos por individuo para cada grupo de tratamiento. Diferentes letras o símbolos indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA seguido de test de Tukey;  $p \leq 0,001$ ).

El número de folículos de la categoría 1-5 mm fue mayor en el grupo tratado exclusivamente con ccrFSH que en el que recibió tratamiento combinado ccrFSH/LH IEX (Figura 10). Dado que la presencia de folículos  $\geq 5$  mm sólo se dio en los grupos de tratamiento combinado con ccrFSH/LH, se deduce que una parte (más de la mitad) de los folículos de diámetro 1-5 mm entró en fase de crecimiento rápido (jerárquicos) por el efecto de LH IEX durante el ensayo.



**Ilustración 34. Aspecto macroscópico de ovarios y oviductos del grupo tratado con ccrFSH (1 µg) + LH IEX (34µg).**  
 Flecha: Huevo intraoviductal en glándula cascarógena



**Figura 11. Peso ovárico y oviductal tras tratamiento con ccrFSH y LH IEX**

Administración en codornices hembra de ccrFSH (1 µg) sola o en combinación con dos dosis de LH IEX (17 y 34 µg) y 34 µg de LH IEX sola cada 24 h durante 15 días. Edad: 42 días. Fotoperiodo: 8hL: 16hO. Las columnas representan la media + DS del peso ovárico y oviductal para cada grupo de tratamiento. Diferentes letras o símbolos indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA seguido de test de Tukey;  $p \leq 0,001$ ).

El análisis del desarrollo folicular y del peso ovárico y oviductal puso de manifiesto el efecto de la administración de LH IEX en el desarrollo de estas estructuras. Dado que el desarrollo del oviducto en aves es dependiente de su exposición al estradiol, y que la LH induce la secreción de estradiol en los folículos de pequeño tamaño y en las células del estroma ovárico (Levorse y Johnson, 1994), el incremento en el peso oviductal del grupo tratado con LH IEX con respecto al grupo Control y al tratado con ccrFSH exclusivamente fue atribuido a la capacidad esteroidogénica de LH IEX sobre el ovario inmaduro sin desarrollo folicular.

El peso oviductal fue significativamente superior en los animales tratados con ccrFSH/LH IEX en comparación con los tratados con LH IEX exclusivamente, lo que sugiere un efecto sinérgico (esteroidogénico) de ambas hormonas. Sin embargo, el mecanismo de esta sinergia presenta dudas. Por un lado, los folículos pequeños (SWF y LWF) son considerados como la fuente principal de secreción de estradiol en el ovario de las aves (Robinson y Etches, 1986). Además, el efecto esteroidogénico de la LH sobre estos folículos es muy superior al de la FSH (Robinson *et al.*, 1988). Por tanto, el desarrollo de folículos pequeños inducido por ccrFSH y la acción de LH IEX sobre una mayor población de estos folículos podría explicar esta sinergia. Por otro lado, el hecho de que la FSH induzca la expresión de los receptores LHR en las células de la granulosa en gallina (A. L. Johnson & Woods, 2009) también podría ser una de las causas de esta sinergia.

Sin embargo, aunque la principal fuente de estradiol en aves sea el conjunto de folículos prejerárquicos, la presencia de folículos jerárquicos en

los grupos tratados con ccrFSH/LH IEX podría constituir una fuente añadida de estradiol, donde la FSH indujera la secreción de progesterona en las células de la granulosa y esta fuera convertida a andrógenos y estradiol en las células de la teca bajo el efecto LH de LH IEX según el modelo “tres células-tres hormonas” (Nitta *et al.*, 1991a, 1991b).

Como en el experimento anterior, la administración aislada de ccrFSH no indujo el desarrollo oviductal, manifestando la incapacidad de esta hormona para la inducción de secreción de estradiol hasta niveles propios de la etapa reproductiva.

El desarrollo de folículos jerárquicos de 5-16,12 mm de diámetro, dependiente de acumulación de vitelogenina y VLDL en el vitelo ovocitario, fue considerado otro signo indirecto de la actividad estrogénica a través de la inducción de la síntesis hepática de estas lipoproteínas.

La consideración conjunta de ambos resultados (crecimiento oviductal y acumulación de vitelo en los ovocitos), debidos al efecto del estradiol, permite concluir que la actividad esteroideogénica de la LH es fundamental para el completo desarrollo del ciclo reproductivo en aves.

Desde el día 13° de tratamiento y hasta el día siguiente a la última dosis (día 16°, necropsia), se produjo la puesta de huevos en los dos grupos que recibieron ccrFSH/LH IEX. En el grupo tratado con ccrFSH/LH IEX (34 µg), cuatro de cinco individuos pusieron un total de cinco huevos y, además, durante la necropsia se encontró un huevo calcificado en el oviducto del individuo 14. En el grupo tratado con ccrFSH/LH IEX (17 µg), un individuo puso un huevo el día 16°. En otros dos individuos de este grupo se encontraron dos huevos intraoviductales (glándula cascarógena) durante la necropsia (Tabla 15).

**Tabla 15. Tabla de oviposiciones en codornices tratadas con ccrFSH + LH IEX**  
 El símbolo ● representa huevo puesto o huevo en oviducto (necropsia).

Día tratamiento		13	14	15	16	(16) Necropsia	Individuo
<b>ccrFSH (1 µg) + LH IEX (34 µg)</b>							13
		●				●	14
					●		15
				●	●		16
			●				17
Día tratamiento		13	14	15	16	(16) Necropsia	Individuo
<b>ccrFSH (1 µg) + LH IEX (17 µg)</b>							18
					●		19
							20
						●	21
							22
						●	23

En este ensayo se produjo la maduración total de folículos ováricos en individuos de los grupos tratados con ccrFSH/LH IEX. Esta maduración fue valorada tanto por el diámetro folicular alcanzado (máximo = 16,12 mm) como por las ovulaciones y oviposiciones ocurridas a lo largo del tratamiento.

Las codornices ponedoras en ciclo de puesta espontáneo observadas a lo largo de estos trabajos presentaron jerarquía folicular ovárica de entre tres y cuatro ( $3,38 \pm 0,5$ ;  $n=23$ ) folículos preovulatorios de diámetro superior a 5 mm. El diámetro folicular máximo medido en estas condiciones fisiológicas fue de 16,34 mm. En el presente experimento, los individuos 14, 16, 17, 19, 21 y 23 presentaron en la necropsia, respectivamente: 12, 19, 14, 11, 6 y 9 folículos  $\geq 5$  mm (preovulatorios). Estos animales ovularon y formaron huevos pese al excesivo número de folículos jerárquicos. Esta disregulación

de la jerarquía con respecto a la jerarquía folicular en condiciones fisiológicas también ha sido referida por otros autores. Wakabayashi *et al.* (1992), administraron extracto glicoproteico de hipófisis de pollo a codornices en condiciones experimentales idénticas a las de los experimentos objeto de este trabajo. Tras dos semanas de tratamiento, el extracto glicoproteico indujo la maduración ovárica completa y la ovulación, aunque, como en nuestro ensayo, la mayoría de los individuos tratados presentaron disregulación de la jerarquía folicular por acúmulo excesivo de folículos preovulatorios. Además, el tratamiento indujo el desarrollo oviductal propio de la etapa de actividad reproductiva en esta especie. El extracto administrado contenía FSH (ensayo de radioreceptor) y LH (radioinmunoensayo) (Wakabayashi *et al.*, 1992).

El excesivo número de folículos preovulatorios observado tanto en el ensayo referido como en el llevado a cabo por nuestro grupo podría tener diferentes explicaciones. Como se ha comentado previamente, la media del número de folículos de diámetro  $\geq 1$  mm fue igual en todos los grupos tratados con ccrFSH (independientemente de la administración de LH IEX). Sin embargo, los folículos  $\geq 5$  mm sólo se desarrollaron en los grupos tratados con ccrFSH/LH IEX. Por tanto, se puede deducir que, en los grupos tratados con ccrFSH/LH IEX, folículos prejerárquicos de la categoría 1-5 mm son seleccionados para formar parte de la categoría de folículos preovulatorios.

La selección de un excesivo número de folículos preovulatorios observada podría ser debida a la presencia de un número suprafisiológico de folículos prejerárquicos sobre los que se ejerce el proceso de selección. Sin embargo, también fue evaluada la hipótesis de que fuera un exceso de actividad LH la responsable de una excesiva selección de folículos prejerárquicos y su posterior evolución a folículos jerárquicos.

Pese al incremento de la dosis de ccrFSH en este ensayo (1  $\mu\text{g}/24\text{ h}$ ) el resultado de su administración exclusiva fue semejante al del experimento anterior: inducción del desarrollo de folículos prejerárquicos sin desarrollo oviductal.

En resumen, los resultados de este ensayo *in vivo* fueron los siguientes:

- La administración de ccrFSH a dosis de  $1\mu\text{g}/24\text{h}$  induce el desarrollo de folículos prejerárquicos de 1-5mm de diámetro pero no el de folículos preovulatorios en codorniz prepúber. Esta dosis tampoco induce desarrollo oviductal.
- LH IEX (dosis de 17-34  $\mu\text{g}/24\text{h}$ ) induce el desarrollo oviductal pero no induce desarrollo folicular.
- El tratamiento combinado ccrFSH/LH IEX induce desarrollo folicular hasta maduración completa, ovulación y oviposición.
- ccrFSH y LH IEX actúan de modo sinérgico en la inducción del desarrollo oviductal.

#### 4.4. EFECTO BIOLÓGICO DE CCRFSH Y ESTRADIOL *IN VIVO* EN CODORNIZ

En el anterior experimento, el efecto esteroidogénico de LH IEX (secreción de estradiol) fue deducido tanto a partir del crecimiento folicular mediante acumulación de vitelo (efecto de la combinación de ccrFSH/LH IEX) como del incremento del peso oviductal (en individuos tratados con LH IEX exclusivamente). El presente ensayo fue planteado con la finalidad de investigar si el desarrollo folicular inducido por el tratamiento combinado ccrFSH/LH IEX fue debido a la actividad esteroidogénica de LH IEX o si, además de este efecto, LH IEX ejerció una función diferente en el desarrollo folicular. Con este propósito, LH IEX se sustituyó por estradiol en el tratamiento combinado con ccrFSH.

Además, la eficacia de la administración de ccrFSH en combinación con estradiol en la inducción del desarrollo folicular podría suponer una menor dependencia de preparados con actividad LH que disminuyera los costes económicos del tratamiento en futuros proyectos de inducción del ciclo reproductivo en aves.

Los animales experimentales fueron hembras de codorniz común de 44 días de edad, alimentadas *ad libitum* y mantenidas en fotoperiodo corto, 8 L:16O.

Se establecieron cuatro grupos experimentales que recibieron los siguientes tratamientos:

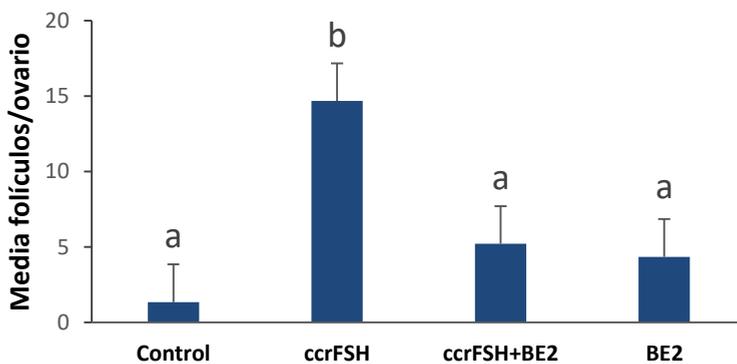
- Grupo 1 (n=5): Control: Aceite de sésamo/etanol (10:1)
- Grupo 2 (n=6): ccrFSH (1µg)
- Grupo 3 (n=6): ccrFSH + Benzoato de estradiol (0,1 mg)
- Grupo 4 (n=6): Benzoato de estradiol (0,1 mg)

El benzoato de estradiol (BE2) (Sigma) se diluyó en etanol absoluto a concentración de 1 mg/0,2 ml. Esta disolución se rediluyó (1:10) en aceite de

sésamo (Sigma). 200  $\mu$ l de esta solución (0,1 mg) se inyectaron por vía intramuscular (pectoral) cada 24 h. La dosis de BE2 utilizada fue comparable a la que tuvo efectos biológicos en experimentos realizados por otros grupos (Ciftci, 2012; Lien *et al.*, 1985). Para su administración en el grupo control, se preparó una dilución 1:10 de etanol/aceite de sésamo. El volumen para cada dosis fue de 200  $\mu$ l en todos los grupos. ccrFSH se administró cada 24h en volumen de 200 $\mu$ l como en los anteriores ensayos.

La duración del tratamiento fue de 15 días. El 16<sup>o</sup> día se realizó la necropsia.

La media de folículos por individuo de diámetro  $\geq 1$  mm fue superior en el grupo tratado con ccrFSH exclusivamente, con media y tamaños foliculares máximos semejantes a los obtenidos en los dos experimentos anteriores (Figura 12. Folículos ováricos de diámetro  $\geq 1$  mm tras tratamiento con ccrFSH y benzoato de estradiol.

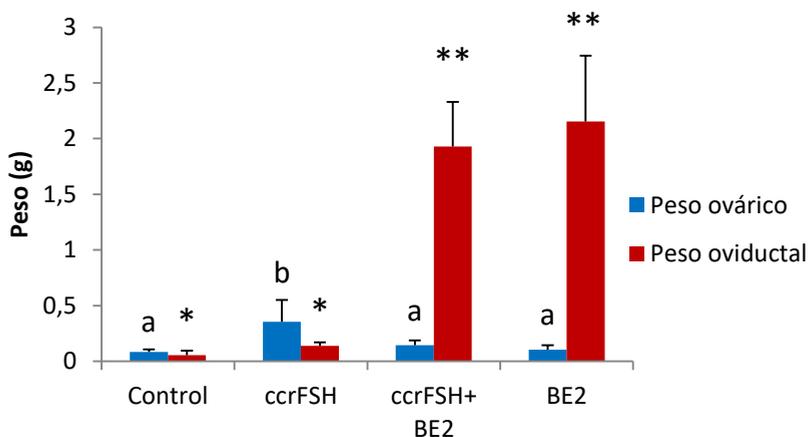


**Figura 12. Folículos ováricos de diámetro  $\geq 1$  mm tras tratamiento con ccrFSH y benzoato de estradiol**

Administración de aceite de sésamo/etanol, ccrFSH (1  $\mu$ g) sola, benzoato de estradiol (1mg) (BE2) o ambas hormonas simultáneamente cada 24 h durante 15 días en codornices hembra. Edad: 44 días. Fotoperiodo: 8L:16O. Las columnas representan la media + DS del número de folículos por individuo para cada grupo de tratamiento. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA seguido de test de Tukey;  $p \leq 0,001$ ).

Sorprendentemente, en el grupo tratado con ccrFSH + BE2 el número medio de folículos de diámetro  $\geq 1$  mm fue igual al del grupo Control e inferior al grupo tratado exclusivamente con ccrFSH. Se deduce de ello que BE2 ejerció un efecto inhibitorio sobre la acción de ccrFSH en el desarrollo folicular en sus fases iniciales (1-5 mm). Dado que la administración de estradiol a dosis semejantes a las utilizadas en este experimento (durante 4-9 días) inhibe la secreción de LH en gallina (El Halawani *et al.*, 1983; S. C. Wilson y Sharp, 1976), se planteó la hipótesis de que este efecto inhibitorio pudiera ejercerse incluso sobre la secreción basal LH en los animales de nuestro experimento. Estos niveles basales podrían ser necesarios para el desarrollo inicial de los folículos bajo el estímulo de ccrFSH. Sin embargo, no pueden descartarse otras causas (efecto tóxico) como responsables de esta inhibición sobre la acción de ccrFSH.

Durante el presente experimento no se produjo ninguna oviposición en ninguno de los individuos.



**Figura 13. Peso ovárico y oviductal tras tratamiento con ccrFSH y benzoato de estradiol.**

Administración de ccrFSH (1  $\mu$ g) sola, benzoato de estradiol (BE2) o la combinación de ambas hormonas cada 24 h durante 15 días en codornices hembra. Edad: 44 días. Fotoperiodo: 8L:16O. Las columnas representan la media

+ DS del número de folículos por individuo para cada grupo de tratamiento. Diferentes letras o símbolos indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA seguido de test de Tukey;  $p \leq 0,001$ ).

La administración de BE2 indujo el desarrollo oviductal (Figura 13). Este incremento resultó comparable al obtenido en el pasado experimento mediante la administración de LH IEX, pero inferior al obtenido en los grupos tratados con ccrFSH + LH IEX. Sin embargo, el peso ovárico (en directa relación con el desarrollo folicular) en los grupos tratados con la combinación de ccrFSH /BE2 y BE2 exclusivamente, fue igual entre sí e igual al peso ovárico del grupo Control. Dado que el peso oviductal sí experimentó cambios significativos, se puede inferir que los niveles de estradiol plasmático fueron más elevados en los grupos que recibieron BE2 y suficientes para inducir el desarrollo de esta estructura. Esto lleva a suponer que los niveles circulantes de estradiol habrían sido suficientes para inducir a nivel hepático la síntesis de proteínas precursoras de las proteínas del vitelo (vitelogenina y VLDL). Sin embargo, dado el escaso desarrollo ovocitario y folicular, se dedujo que estas proteínas no fueron incorporadas al vitelo pese a la acción de ccrFSH, y que, además, la actividad LH podría tener un papel decisivo e independiente de su capacidad esteroidogénica en este proceso.

En resumen, los resultados de este ensayo *in vivo* fueron los siguientes:

- La administración de 1 mg/24h de benzoato de estradiol induce el desarrollo del oviducto en codorniz prepúber
- El benzoato de estradiol inhibe el efecto inductor del desarrollo folicular de ccrFSH cuando estas dos hormonas se administran de forma combinada

#### 4.5. EFECTO BIOLÓGICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE CCRFSH Y ECG *IN VIVO* EN CODORNIZ

Los resultados de los tres experimentos anteriores sugieren que el concurso de la actividad LH, independientemente de su capacidad esteroidogénica, es necesario para el desarrollo y maduración folicular en codorniz.

La inexistencia de una LH recombinante específica, y el bajo rendimiento en la purificación de LH a partir de adenohipófisis aviar (65 mg a partir de 6.000 adenohipófisis en nuestro caso) podrían constituir factores limitantes en la aplicación futura de protocolos de inducción del ciclo ovárico en aves. Por este motivo se decidió la utilización de un preparado hormonal comercial con actividad LH en aves, la gonadotropina coriónica equina (eCG), como sustituto de la LH aviar purificada.

La eCG posee actividad FSH y LH en aves. Además, esta hormona ha sido utilizada en diferentes experimentos de inducción del ciclo reproductivo en gallina y codorniz. Sin embargo, la disregulación de la jerarquía folicular por excesivo número de folículos preovulatorios y el bajo porcentaje de animales que experimentan ovulación y puesta de huevos son una constante en estos experimentos (Bennett, 2002).

En nuestros experimentos *in vitro* se demostró la actividad FSH y LH de eCG en células de la granulosa de folículos preovulatorios. Por otro lado, se atribuye a eCG una mayor actividad FSH que LH. Sin embargo, esta actividad se describe sólo en folículos preovulatorios de gallina en ciclo de puesta (A. L. Johnson y Leone, 1985; Wells *et al.*, 1985) o en mamíferos (Stewart *et al.*, 1976). La actividad predominante FSH podría ser la causa del exceso de folículos preovulatorios y, como consecuencia, del escaso éxito en la inducción del ciclo con esta hormona en aves (Bennett, 2002).

Teniendo en cuenta estas referencias, la administración conjunta de FSH y eCG tendría escaso sentido lógico, dado que, añadir efecto FSH a la acción FSH-predominante de eCG sólo podría, probablemente, empeorar los resultados.

En estudios realizados por otros autores, la dosis eficaz mínima para inducir el desarrollo ovárico en codornices prepuberales se estableció en 20 UI/24 h (Bennett, 2002). Sin embargo, en ensayos *in vivo* previos a esta tesis realizados con bajas dosis de eCG (10 UI/24 h) se evidenció la inducción de desarrollo oviductal completo (efecto esteroideogénico LH) con escaso desarrollo folicular (efecto FSH). Estas pruebas sugirieron que la *ratio* de actividad FSH/LH de eCG en codornices prepúberes podría ser diferente a lo indicado en la bibliografía para gallina en ciclo de puesta. Por tanto, una baja dosis de eCG proporcionaría suficiente actividad LH e insuficiente actividad FSH para el desarrollo del ciclo ovárico. La adición de ccrFSH a estas bajas dosis de eCG podría inducir el ciclo ovárico hasta la maduración folicular completa. Por estas razones, se planteó un ensayo utilizando dosis de eCG insuficientes para el desarrollo folicular en combinación con ccrFSH.

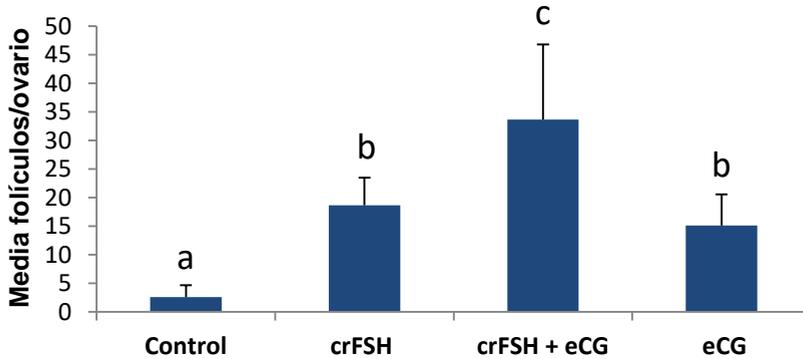
#### **4.5.1. Administración de ccrFSH (1 µg) en combinación con 10 UI eCG**

Se establecieron cuatro grupos experimentales que recibieron los siguientes tratamientos:

- Grupo 1 (n=5): Grupo Control: Suero fisiológico
- Grupo 2 (n=7): ccrFSH (1 µg)
- Grupo 3 (n=6): ccrFSH (1 µg) + 10 UI eCG
- Grupo 4 (n=7): 10 UI eCG

La duración del tratamiento fue de 18 días, en idénticas condiciones experimentales que en los ensayos descritos previamente. La eCG se diluyó

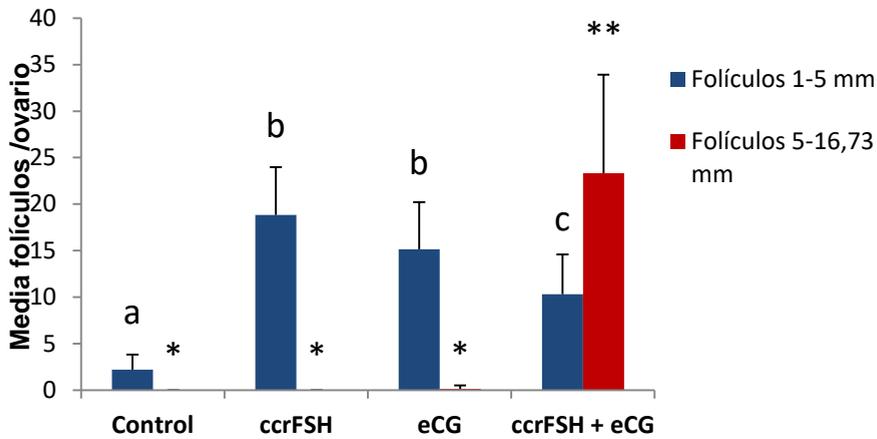
en suero fisiológico. Todos los grupos recibieron el tratamiento por vía intramuscular (200  $\mu$ l) cada 24 horas.



**Figura 14. Folículos ováricos de diámetro  $\geq 1$  mm tras tratamiento con ccrFSH y 10 UI eCG**

Administración de ccrFSH (1  $\mu$ g), 10 UI de eCG, y la combinación de ambas hormonas cada 24 h durante 18 días en codornices hembra. Edad: 45 días. Fotoperiodo: 8L:16O. Las columnas representan la media + DS del número de folículos por individuo para cada grupo de tratamiento. Diferentes letras o símbolos indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA seguido de test de Tukey;  $p \leq 0,001$ ).

La media de folículos de diámetro  $\geq 1$  mm fue superior en el grupo que recibió tratamiento combinado con ccrFSH y eCG respecto a los demás grupos. La media de folículos  $\geq 1$  mm en el grupo tratado con ccrFSH exclusivamente fue semejante a la de los experimentos anteriores (Figuras 7 y 10), pero menor que en el grupo tratado con ccrFSH/eCG (Figura 14).



**Figura 15. Folículos ováricos agrupados por diámetro folicular (1-5 y 5-16,73 mm) tras tratamiento con ccrFSH y 10 UI eCG**

Administración de ccrFSH (1  $\mu$ g), 10 UI de eCG y la combinación de ambas hormonas cada 24 h durante 18 días en codornices hembra. Edad: 45 días. Fotoperiodo: 8L:16O. Las columnas representan la media + DS del número de folículos por individuo para cada grupo de tratamiento. Diferentes letras o símbolos indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA seguido de test de Tukey;  $p \leq 0,001$ ).

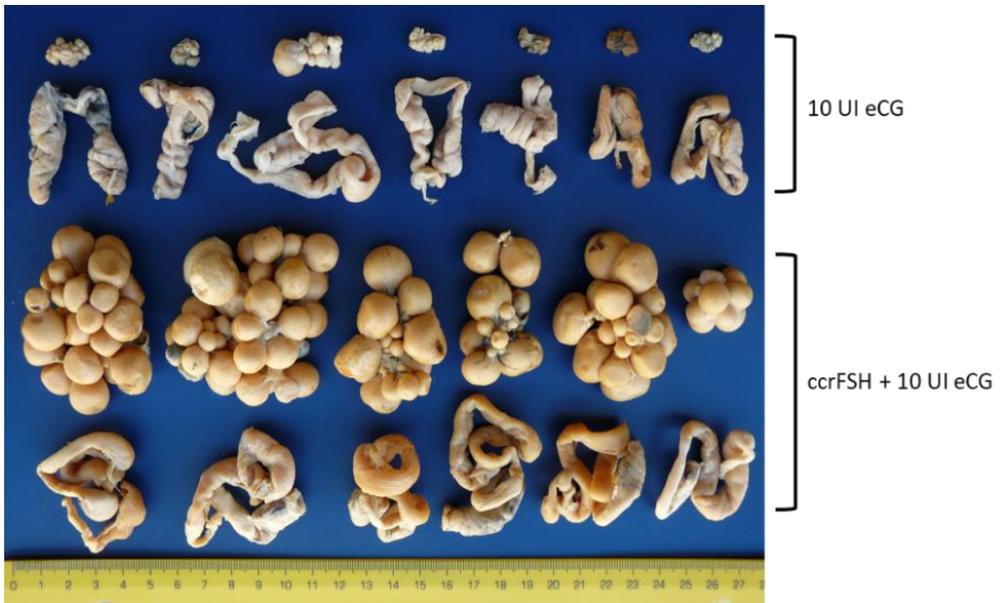
Pese al incremento de tres días en la duración del tratamiento con respecto a los experimentos anteriores, la administración exclusiva de ccrFSH tampoco indujo en este ensayo el desarrollo de folículos de diámetro  $\geq 5$  mm. En el grupo tratado con eCG, sólo un folículo superó este diámetro.

El número de folículos de diámetro 1-5 mm no fue significativamente diferente entre los grupos que recibieron ccrFSH o 10 UI eCG de forma aislada. En el experimento anterior, el grupo tratado únicamente con LH IEX no experimentó desarrollo significativo de folículos de diámetro  $\geq 1$  mm pese a su evidente actividad LH a las dosis utilizadas. Por tanto, el hecho de que en el presente experimento la media de folículos de diámetro 1-5 mm fuera igual en los grupos tratados exclusivamente con ccrFSH o eCG se atribuyó a la actividad FSH de eCG.

En el grupo tratado con la combinación de ccrFSH y eCG, el número de folículos de diámetro 1-5 mm fue menor que en los grupos tratados con ccrFSH o eCG exclusivamente (Figura 15).

Sin embargo, la combinación ccrFSH/eCG indujo el desarrollo de un número de folículos preovulatorios ( $\geq 5$  mm) superior incluso al número total de folículos de 1-5 mm (Figura 15).

La acumulación de folículos de diámetro  $\geq 5$  mm en el grupo tratado con ccrFSH/eCG ( $23,33 \pm 10,59$ ) provocó la disregulación de la jerarquía en forma de estimulación suprafisiológica.



**Ilustración 35. Aspecto macroscópico de los ovarios y oviductos de codornices inmaduras tratadas durante dieciocho días con ccrFSH + 10 UI eCG**

En el experimento realizado con ccrFSH y LH IEX, los grupos tratados con ccrFSH exclusivamente y con la combinación ccrFSH/LH IEX presentaron un mismo número de folículos de diámetro  $\geq 1$  mm (Figura 9). Este resultado sugirió que el número total de estos folículos es dependiente del efecto FSH, mientras que el crecimiento y maduración desde los 5 mm de

diámetro hasta su maduración final requería la acción de la LH. El hecho de que en el presente experimento el número total de folículos con diámetro  $\geq 1$  mm fuera superior en el grupo tratado con ccrFSH/eCG que en el grupo tratado con ccrFSH exclusivamente, sugirió la siguiente hipótesis: el efecto sumatorio de la actividad FSH de ccrFSH y eCG, *per se*, indujo el desarrollo de este tipo de folículos en número superior al observado en el grupo tratado sólo con ccrFSH. Sin embargo, no pudo descartarse el efecto sinérgico de ccrFSH con la actividad LH de eCG como explicación de este fenómeno.

A pesar de esta acumulación ovárica de folículos preovulatorios, tres de los seis animales tratados con ccrFSH/eCG pusieron huevos durante el tratamiento.

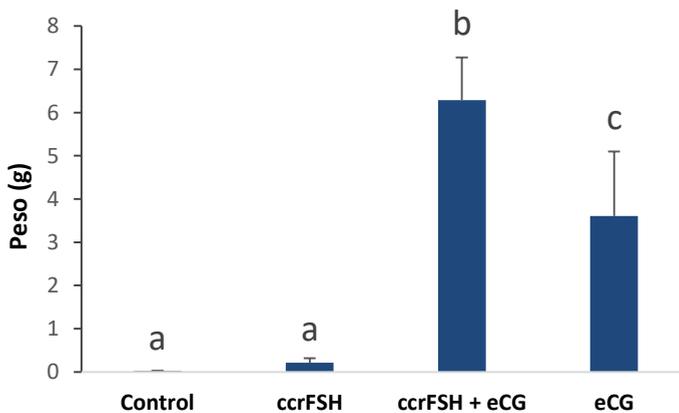
**Tabla 16. Tabla de oviposiciones en codornices tratadas con ccrFSH + 10 UI eCG.**

El símbolo ● representa huevo puesto.

Día tratamiento	11	12	13	14	15	16	17	18	Individuo
ccrFSH (1 $\mu$ g) + 10 UI eCG								●	34
									35
									36
	●		●						37
									38
							●	●	39

Diferentes autores han demostrado que la administración de eCG en gallina, en dosis suficientes para la inducción del desarrollo folicular, induce también el incremento de las concentraciones de estradiol y progesterona plasmáticos, disregulación de la jerarquía folicular preovulatoria, descenso de la concentración de LH plasmática y bloqueo de la ovulación con cese de

la puesta (Fraps y Riley, 1942; A. L. Johnson, 1986; A. L. Johnson y Leone, 1985; Palmer y Bahr, 1992). El excesivo desarrollo de folículos preovulatorios y el incremento de peso oviductal observados en el presente experimento sugirieron una elevada concentración plasmática de estradiol. Sin embargo, el posible efecto de retroalimentación negativa del estradiol sobre la secreción de la oleada preovulatoria de LH no se dio presumiblemente en los tres individuos que ovularon y formaron huevos. En el caso de la administración conjunta de FSH/LH IEX, las ovulaciones podrían haber sido inducidas por los incrementos agudos de LH plasmática tras la administración intramuscular de las dosis. Sin embargo, la administración diaria de eCG, no sólo no induce la ovulación de folículos maduros sino que, además, la inhibe (Fraps y Riley, 1942), lo que sugiere que las ovulaciones en el presente ensayo ocurrieron tras descargas hipofisarias espontáneas de LH.



**Figura 16. Peso oviductal tras tratamiento con ccrFSH (1 µg) y 10 UI eCG.**

Administración de ccrFSH (1 µg), 10 UI de eCG y la combinación de ambas hormonas cada 24 h durante 18 días en codornices hembra. Edad: 45 días. Fotoperiodo: 8L: 16O. Las columnas representan la media + DS del número de folículos por individuo para cada grupo de tratamiento. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA seguido de test de Tukey;  $p \leq 0,001$ ).

El peso oviductal fue superior en el grupo tratado con ccrFSH/eCG. El desarrollo oviductal en el grupo tratado solamente con eCG fue significativamente superior respecto al tratamiento con ccrFSH y Control (Figura 16). Sin embargo, como ocurrió en la administración combinada de ccrFSH/LH IEX (Figura 11), el grupo tratado con ccrFSH y eCG presentó un desarrollo oviductal significativamente superior al observado en el resto de los grupos. Es probable que el efecto sinérgico de estas dos hormonas a nivel esteroideogénico sea el responsable, en gran medida, de este incremento. Pero también es posible (como se comentó en “Efecto biológico del tratamiento combinado con crFSH y LH IEX *in vivo* en codorniz”) que un mayor número de folículos esteroideogénicos (tanto prejerárquicos como preovulatorios) en el grupo tratado con ccrFSH/eCG influyera decisivamente en la secreción de estradiol y, de modo secundario, en el desarrollo oviductal.

En resumen, los resultados de este ensayo *in vivo* fueron los siguientes:

- La administración de 10 UI eCG/24h induce desarrollo oviductal y desarrollo de folículos prejerárquicos en codorniz prepúber, pero no de folículos preovulatorios
- La administración combinada de 1µg de ccrFSH y 10 UI eCG induce el desarrollo de un mayor número de folículos prejerárquicos respecto a la administración de estas hormonas por separado
- La administración combinada de 1µg de ccrFSH y 10 UI eCG induce el desarrollo de un excesivo número de folículos preovulatorios y la puesta de huevos. Además, induce un incremento del peso oviductal superior al de ambas hormonas administradas por separado

#### 4.5.2. Efecto de la reducción de dosis de ccrFSH y eCG

El resultado de hiperestimulación ovárica obtenido en el experimento anterior sugirió un posible exceso de actividad FSH y que parte de esa actividad pudiera deberse a la actividad FSH de eCG. Sin embargo, no se pudo descartar que un excesivo efecto LH de eCG (administrada junto a ccrFSH), tuviera influencia decisiva en el exceso de folículos preovulatorios observados en la necropsia.

Dado que estos experimentos estuvieron dirigidos a la obtención de un protocolo de inducción del ciclo reproductivo de características lo más próximas posible a las fisiológicas, a la inducción de la puesta del mayor número de huevos por individuo, y al mayor porcentaje posible de individuos con puesta, se planteó un nuevo ensayo para valorar el efecto de una reducción de la actividad FSH total administrada mediante la reducción a la mitad de las dosis de ccrFSH empleadas en los tres últimos experimentos. La nueva dosis (0,5 µg de ccrFSH) se administró en combinación tanto con la dosis de eCG utilizada en el experimento anterior (10 UI) como con una menor dosis de esta hormona (7,5 UI).

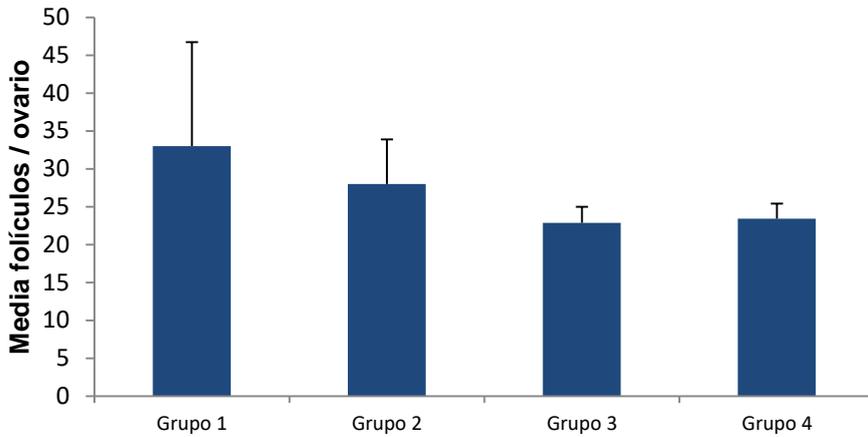
La administración intramuscular de eCG cada 48 horas en codorniz japonesa resulta eficaz en la inducción de maduración folicular ovárica (Bennett, 2002). Además, el linker CTP (péptido c-terminal de la HCG) presente en ccrFSH incrementa la vida media plasmática de esta hormona (Klein *et al.*, 2003). Por estos motivos se diseñó el ensayo de modo que dos grupos recibieran las dosis cada 48 h y otros dos grupos cada 24 h, siendo la dosis total a lo largo del experimento igual para cada par de grupos. Por tanto, en los grupos que recibieron el tratamiento cada 48 horas, las dosis fueron el doble que las administradas cada 24 horas a los otros dos grupos. Los individuos tratados cada 48 h recibieron inyecciones de suero fisiológico los días en que no fueron tratados con gonadotropinas.

En este experimento no se incluyó un grupo control negativo ni grupos tratados con ccrFSH o eCG aisladas. Los tratamientos con ccrFSH o eCG ya habían sido probados en los ensayos previos aportando resultados homogéneos y consistentes. De este modo, este ensayo se diseñó con la finalidad de valorar el resultado de la reducción de dosis de ccrFSH en combinación con las dos dosis de eCG mencionadas y, al mismo tiempo, con el objeto de comparar la eficacia de la administración de las dosis administradas cada 24 o 48 h. La eficacia del tratamiento cada 48 h sería conveniente para evitar al máximo el manejo de los animales (sobre todo salvajes) en los que aplicar un protocolo de inducción del ciclo reproductivo.

Se establecieron cuatro grupos experimentales que recibieron los siguientes tratamientos:

- Grupo 1 (n=7): ccrFSH (0,5 µg) + 10 UI eCG/24 h
- Grupo 2 (n=7): ccrFSH (1 µg) + 20 UI eCG/48 h
- Grupo 3 (n=7): ccrFSH (0,5 µg) + 7,5 UI eCG/24 h
- Grupo 4 (n=7): ccrFSH (1 µg) + 15 UI eCG/48 h

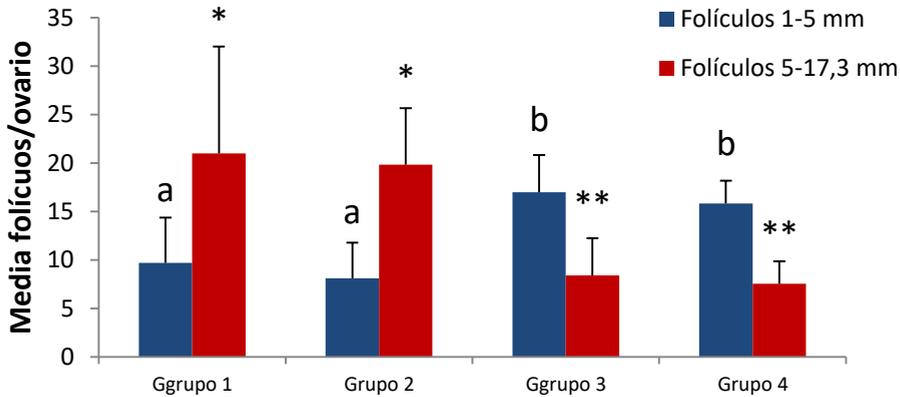
Las condiciones experimentales, vía de administración, volumen administrado y duración del tratamiento, fueron idénticas a las del experimento anterior.



**Figura 17. Folículos ováricos de diámetro  $\geq 1$  mm tras tratamiento con ccrFSH y eCG**

Administración intramuscular de 0,5  $\mu\text{g}$  de ccrFSH + 10UI de eCG cada 24 h (Grupo 1), ccrFSH (1  $\mu\text{g}$ ) + 20 UI eCG/48 h (Grupo 2), ccrFSH (0,5  $\mu\text{g}$ ) + 7,5 UI eCG/24 h (Grupo 3) y ccrFSH (1  $\mu\text{g}$ ) + 15 UI eCG/48 h (Grupo 4) durante 18 días en codornices hembra. Edad: 43 días. Fotoperiodo: 8L:16O. Las columnas representan la media + DS del número de folículos por individuo para cada grupo de tratamiento. Diferentes letras o símbolos indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA seguido de test de Tukey;  $p \leq 0,001$ ).

Pese a la reducción de la dosis de ccrFSH en un 50%, la media de folículos de diámetro  $\geq 1$  mm en el grupo tratado con ccrFSH (0,5  $\mu\text{g}$ ) + 10 UI eCG cada 24h fue semejante ( $33 \pm 13,73$ ) a la del grupo que recibió ccrFSH (1  $\mu\text{g}$ ) + 10 UI de eCG en el experimento anterior ( $33,66 \pm 13,15$ ) (Figuras 15 y 17).



**Figura 18. Folículos ováricos agrupados por diámetro folicular tras tratamiento con ccrFSH y eCG**

Administración intramuscular de 0,5  $\mu$ g de ccrFSH + 10UI de eCG cada 24 h (Grupo 1), ccrFSH (1  $\mu$ g) + 20 UI eCG/48 h (Grupo 2), ccrFSH (0,5  $\mu$ g) + 7,5 UI eCG/24 h (Grupo 3) y ccrFSH (1  $\mu$ g) + 15 UI eCG/48 h (Grupo 4) durante 18 días en codornices hembra. Edad: 43 días. Fotoperiodo: 8L:16O. Las columnas representan la media + DS del número de folículos por individuo para cada grupo de tratamiento. Diferentes letras o símbolos indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA seguido de test de Tukey;  $p \leq 0,001$ ;  $n = 7$ ).

No hubo diferencias significativas en la media de folículos  $\geq 1$  mm entre los grupos de este ensayo (Figura 17). Sin embargo, sí las hubo al analizar el número de folículos agrupados según categorías de diámetros: 1-5 mm y 5-17,3mm (Figura 18). En los grupos tratados con menor dosis de eCG (7,5 UI/24h y 15 UI/48 h) se observó un número menor de folículos preovulatorios de 5-17,3mm. El número medio de estos folículos por individuo fue inferior a la mitad que en los grupos tratados con mayor dosis de eCG (10 UI/24 h y 20 UI/48 h) (Figura 18). Dado que el número medio de folículos  $\geq 1$  mm fue igual en todos los grupos, la diferencia en el número de folículos de 5-17,3 mm entre grupos se puede atribuir a las diferentes dosis de eCG administrada. De este modo, una reducción del 25% en la dosis de

eCG fue suficiente para inducir el desarrollo de un menor número de folículos preovulatorios, con una maduración ovárica más semejante a la fisiológica que la obtenida en los grupos tratados con una dosis mayor.

A pesar de la reducción de las dosis de ambas hormonas, la media de folículos de diámetro  $\geq 5$  mm fue superior en todos los grupos respecto a la observada en codorniz en ciclo de puesta espontáneo ( $3,38 \pm 0,5$ ).

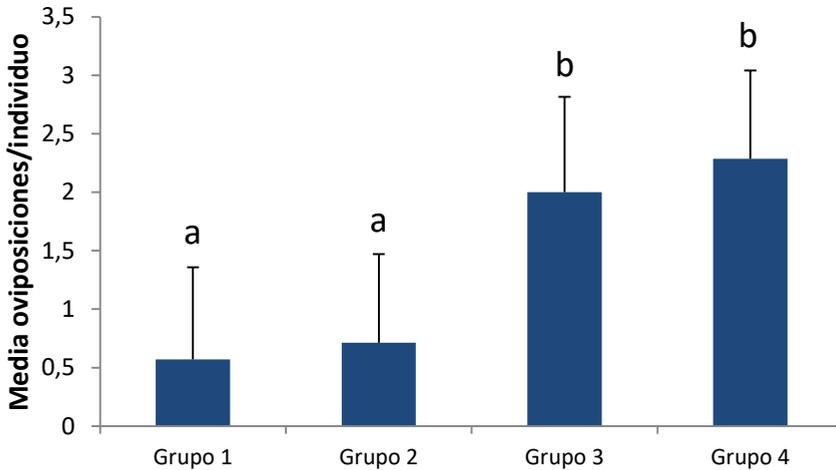
**Tabla 17. Tabla de oviposiciones en codornices tratadas con ccrFSH + eCG**

El símbolo ● representa huevo puesto o huevo en oviducto (necropsia).

ccrFSH 0,5 $\mu$ g + 10 UI eCG /24h	Día	11	12	13	14	15	16	17	18	19 (necropsia)	Individuo
			●			●			●		4.1
											4.2
											4.3
											4.4
											4.5
		●									4.6
											4.7
ccrFSH 1 $\mu$ g + 20 UI eCG /48h	Día	11	12	13	14	15	16	17	18	19 (necropsia)	Individuo
					●		●				4.15
											4.16
			●		●						4.17
											4.18
											4.19
							●			4.20	
											4.21
ccrFSH 0,5 $\mu$ g + 7,5 UI eCG /24h	Día	11	12	13	14	15	16	17	18	19 (necropsia)	Individuo
				●			●	●	●	●	4.8
					●						4.9
					●	●					4.10
			●				●	●			4.11
						●					4.12
					●					●	4.13
							●			4.14	
ccrFSH 1 $\mu$ g + 15 UI eCG /48h	Día	11	12	13	14	15	16	17	18	19 (necropsia)	Individuo
				●			●		●		4.22
							●				4.23
			●		●			●			4.24
			●				●				4.25
					●			●			4.26
							●			●	4.27
	●		●							4.28	

Las puestas de huevos comenzaron el día once de tratamiento y continuaron hasta el día de la necropsia. En los grupos tratados con dosis de 0,5  $\mu$ g de ccrFSH + 10 UI eCG/24 h y 1  $\mu$ g de ccrFSH + 20 UI/48 h, tres y cuatro de siete animales, respectivamente, pusieron huevos. En los grupos

tratados con 0,5  $\mu\text{g}$  de ccrFSH + 7,5 UI/24 h y 1  $\mu\text{g}$  de ccrFSH +15 UI/48 h, todos los animales pusieron huevos.



**Figura 19. Oviposiciones y huevos intraoviductales tras tratamiento con ccrFSH y eCG**

Administración intramuscular de 0,5  $\mu\text{g}$  de ccrFSH + 10UI de eCG cada 24 h (Grupo 1), ccrFSH (1  $\mu\text{g}$ ) + 20 UI eCG/48 h (Grupo 2), ccrFSH (0,5  $\mu\text{g}$ ) + 7,5 UI eCG/24 h (Grupo 3) y ccrFSH (1  $\mu\text{g}$ ) + 15 UI eCG/48 h (Grupo 4) durante 18 días en codornices hembra. Edad: 43 días. Fotoperiodo: 8h L: 16h O. Las columnas representan la media + DS del número de huevos puestos (o intraoviductales) por individuo para cada grupo de tratamiento. Diferentes letras o símbolos indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA seguido de test de Tukey;  $p \leq 0,05$ ).

La media del número de huevos puestos y huevos intraoviductales en la necropsia fue significativamente superior en los dos grupos que recibieron menor dosis de eCG y estuvo asociada en relación inversa a la media de folículos preovulatorios. El menor número de folículos preovulatorios en los animales tratados con las dosis inferiores de eCG podría ser atribuido a una menor actividad LH derivada de la reducción de estas dosis. Sin embargo, dado que esta reducción de dosis también implicó un descenso de la actividad FSH propia de eCG, no se pudo deducir que el menor número de

folículos preovulatorios en los grupos tratados con menor dosis de eCG fuera debido a una menor actividad actividad LH o FSH.

Tanto en el experimento anterior como en el presente, las ovulaciones se dieron de forma espontánea, sin la administración específica de un preparado hormonal inductor de la ovulación. La superior media de oviposiciones en los grupos tratados con las dosis inferiores de eCG y asociadas a un menor número de folículos preovulatorios podría deberse a una mayor incidencia de descargas preovulatorias hipofisarias de LH debidas a menores concentraciones de estradiol plasmático, mientras que en los grupos con mayor número de folículos preovulatorios, el exceso de la secreción de estradiol podría haber inhibido en parte, mediante retroalimentación negativa, la liberación episódica de LH.

La administración de la dosis ccrFSH/eCG cada 48h fue tan eficaz como esta misma dosis repartida de forma diaria en la inducción del desarrollo folicular y en el número de oviposiciones por individuo.

Uno de los objetivos iniciales del trabajo con codornices fue la obtención de crías viables de la especie. Para ello, resultó necesaria la fecundación de las hembras tratadas mediante dos posibles procedimientos: cópula e inseminación artificial. En experimentos previos a los trabajos de esta tesis en los que se realizó la inducción del ciclo con extractos glicoproteicos de adenohipófisis de pollo y eCG, se introdujo repetidamente a las hembras prepúberes tratadas en jaulas con machos reproductivamente activos. Sin embargo, los machos no copularon en ninguna ocasión con estas hembras.

Por otro lado, la inseminación artificial en aves ha sido utilizada para la obtención de progenie en gallina (Burrows y Quinn, 1938) y en codorniz (Lukaszewicz *et al.*, 2008; Chelmonska, 2008; Marks y Lepore, 1965; Wentworth y Mellen, 1963). Los trabajos en codorniz fueron realizados con la variedad japonesa, de tamaño muy superior a la codorniz común europea con la que se realizaron nuestros trabajos. Quizá por este motivo, en nuestro

caso, los intentos de obtener cantidades suficientes de esperma siguiendo los protocolos descritos en la literatura específica, fracasaron. Esporádicamente, se consiguieron escasas cantidades de fluido aparente espermático en el que se pudieron observar ocasionales espermatozoides móviles (consideradas insuficientes para la inseminación artificial).

Con esta perspectiva, los trabajos en codornices estuvieron encaminados únicamente al estudio del efecto biológico *in vivo* de ccrFSH, a su utilización en combinación con preparados con actividad LH para la inducción del ciclo, y a la aproximación a un protocolo de estimulación ovárica aplicable a otras especies.

En resumen, los resultados de este ensayo *in vivo* fueron los siguientes:

- La administración combinada 0,5 µg de ccrFSH + 7,5 UI eCG cada 24h o de 1 µg de ccrFSH + 15 UI eCG cada 48h indujo la puesta de huevos en el 100% de los individuos tratados en codorniz prepúber.
- Estas dosis indujeron un número suprafisiológico de folículos preovulatorios.
- En el tratamiento combinado con ccrFSH y eCG, el incremento de la dosis de eCG en 2,5 UI/24 o 5 UI/48h induce un aumento del número de folículos preovulatorios y una disminución tanto del número de individuos en puesta como en la media de oviposiciones por individuo respecto a los individuos tratados con menores dosis de eCG.

## 4.6. INDUCCIÓN DEL CICLO REPRODUCTIVO EN PALOMA BRAVÍA MEDIANTE CCRFSH Y ECG

Los experimentos realizados en codorniz común demostraron la actividad biológica *in vivo* de ccrFSH y la posibilidad de inducir el desarrollo folicular completo y la ovulación en esta especie.

Sin embargo, y dado que uno de los motivos de los trabajos desarrollados en esta tesis es la aplicación futura de esta investigación en la inducción de ciclos reproductivos en aves amenazadas, se consideró necesario el ensayo de los protocolos de inducción del ciclo reproductivo en hembras de otra especie con diferentes características en la fisiología de su dinámica folicular ovárica.

Las aves columbiformes (palomas y tórtolas), son aves de puesta determinada de dos huevos. Como consecuencia de esta característica biológica, la dinámica folicular en paloma difiere de la observada en aves de puesta indeterminada (codorniz). En palomas, sólo se produce el desarrollo de dos folículos preovulatorios por ciclo (Goerlich *et al.*, 2010; Matthews, 1939), mientras que en las aves de puesta variable e indeterminada, el número de folículos preovulatorios es también variable (Haywood, 1993; Kennedy, 1991). Este tipo de dinámica folicular proporciona un modelo experimental diferente que permitiría incrementar el conocimiento en la inducción del ciclo ovárico en especies aviares.

Además de las características biológicas expuestas, la facilidad para la obtención de los individuos y el hecho de que existan protocolos de inseminación artificial definidos para esta especie, condujeron a su utilización como especie experimental en la que poder ensayar el proceso completo de inducción artificial del ciclo reproductivo en hembras y la obtención de progenie.

Por otro lado, también se consideró necesario un método para el seguimiento del desarrollo folicular en los ciclos inducidos en aves. Este método debería permitir la valoración de la respuesta al tratamiento gonadotropo de la forma más inmediata posible.

La ecografía es un método de diagnóstico por imagen ampliamente implantado en medicina y veterinaria. En diferentes ocasiones, este método ha sido utilizado para la caracterización del estado reproductivo en gallina, codorniz y avestruz (Bronneberg y Taverne, 2003; Melnychuk *et al.*, 2002; Sreesujatha *et al.*, 2016). Se trata de un método no invasivo de visualización indirecta e inmediata de la estructura explorada, con precisión de hasta 0,1 mm en la medición de estas estructuras y con capacidad para el almacenamiento de imagen en la mayoría de los equipos. Por estos motivos, en este experimento se procedió al ensayo de su utilización como posible método para el control de la evolución de los folículos ováricos en los ciclos inducidos en aves.

En ecografía, los folículos preovulatorios aviares se identifican con estructuras hipoecogénicas de aspecto redondeado en cuyo interior pueden apreciarse diferentes capas concéntricas hiper e hipoecogénicas, aunque esta última característica es difícilmente apreciable al congelar la imagen. Este tipo de estructura en anillos concéntricos también se puede observar en la yema del huevo (Cartee *et al.*, 1992).

#### **4.6.1. Evaluación de la actividad biológica de eCG y EGP en paloma**

Como se comentó previamente, la administración de extractos de adenohipófisis de pollo induce el desarrollo folicular ovárico en gallina y codorniz (Taber *et al.*, 1958; Wakabayashi *et al.*, 1992).

La secuencia aminoacídica (proteína madura) de la subunidad  $\alpha$  común a las gonadotropinas hipofisarias es idéntica en codorniz, pavo y paloma, mientras las subunidades  $\beta$ -FSH y  $\beta$ -LH de codorniz y pavo tienen un alto grado de homología entre sí. Si la administración de extracto glicoproteico de adenohipófisis de pavo indujera el desarrollo folicular en paloma, se podría deducir de ello que tanto la FSH como la LH presentes en el extracto activan sus respectivos receptores en esta especie. Como consecuencia, sería probable que ccrFSH (secuencia aminoacídica de codorniz) activara también el receptor FSHR en paloma.

No se encontraron referencias respecto a la administración de eCG en columbiformes. Sin embargo, el hecho de que esta hormona posea actividad biológica FSH y LH en codorniz y gallina (Girling *et al.*, 2002) pese a la distancia filogenética entre estas especies y la equina, hace suponer como probable esta doble actividad también en paloma.

De este modo, se decidió realizar el presente ensayo mediante la administración de extracto glicoproteico de pavo (EGP) obtenido en "Purificación de hormonas hipofisarias" y eCG en palomas hembra para determinar en esta especie la actividad biológica de FSH y LH de pavo y la actividad FSH/LH de eCG. La actividad LH de eCG y EGP permitiría su utilización, en combinación con ccrFSH, en la inducción del desarrollo folicular y la ovulación.

En aves columbiformes (palomas y tórtolas), el ciclo ovárico sólo se desarrolla si la hembra tiene contacto auditivo y visual con el macho, aunque, ocasionalmente, el contacto visual con otras hembras puede desencadenar el crecimiento folicular e incluso la puesta (Barfield, 1971; Matthews, 1939). Por este motivo, en el presente ensayo se mantuvo a los ejemplares hembra de paloma en jaulas individuales y en condiciones de aislamiento visual con respecto al resto de individuos.

El sexo de las palomas utilizadas en este experimento se identificó mediante técnicas de sexado molecular a partir de pluma. El peso medio de los animales fue  $261,3 \pm 12,5$  g, y su edad desconocida. El ensayo se desarrolló en condiciones de temperatura y fotoperiodo natural, con suministro de alimento y agua *ad libitum*.

Se establecieron tres grupos experimentales en función del tratamiento:

- Grupo A (n= 6): Control. Suero fisiológico
- Grupo B (n= 7): Extracto glicoproteico de adenohipófisis de pavo (EGP), 144  $\mu\text{g}/24$  h
- Grupo C (n= 7): 30 UI eCG/24 h

La duración del tratamiento fue de 14 días en el Grupo B, y de 18 días en los grupos A y C. EGP y eCG se diluyeron en suero fisiológico. Todos los grupos recibieron el tratamiento por vía intramuscular (200  $\mu\text{l}$ ) cada 24 horas. La administración cada 24 h en vez de cada 48 h (como la llevada a cabo en el último experimento en codorniz), se decidió en función de los datos publicados con respecto a la vida media de FSH (9 h) y LH (8 h) en codorniz tras la inyección de extracto glicoproteico de adenohipófisis de pollo. Veinticuatro horas tras la administración intramuscular de este preparado, las concentraciones plasmáticas de FSH y LH se hallaron en niveles basales (Wakabayashi *et al.*, 1992).

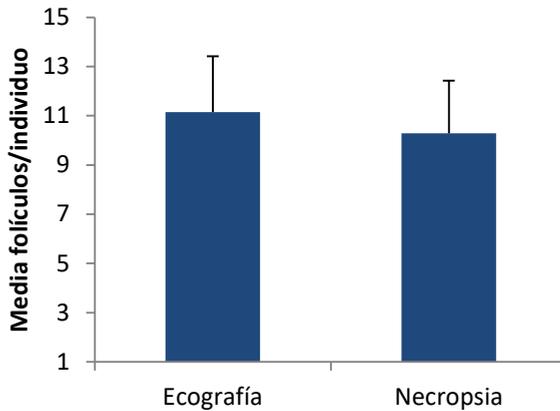
La dosis de EGP en el Grupo B (144  $\mu\text{g}/24\text{h}$ ) fue inferior ( $\approx 50\%$ ) a la dosis de extracto glicoproteico de hipófisis de pollo que indujo desarrollo folicular completo en codorniz japonesa (Wakabayashi *et al.*, 1992). Las codornices tratadas por estos autores presentaron hiperestimulación ovárica en el grupo tratado con dosis alta de extracto (300 $\mu\text{g}/24$  h), mientras que la dosis de 60  $\mu\text{g}/24$  h no indujo desarrollo folicular completo.

La dosis de eCG (30 UI/ 24 h) fue semejante (adaptada al peso) a las 10 UI que resultaron efectivas en la inducción de desarrollo oviductal en codorniz.

Se realizaron exploraciones ecográficas los días 1<sup>o</sup> y 14<sup>o</sup> del experimento en los tres grupos, y el día 18<sup>o</sup> en los grupos C (eCG) y Control. La necropsia se realizó el día 14<sup>o</sup> en el Grupo B (EGP) y el 18<sup>o</sup> en los grupos C y Control.

En la exploración ecográfica del día 1<sup>o</sup> no se observaron estructuras compatibles con folículos ováricos en ninguno de los individuos experimentales. En el día 14<sup>o</sup> de tratamiento, se observaron por ecografía estructuras compatibles con folículos ováricos en todos los individuos tratados con EGP. Sin embargo, en los grupos C y Control, no fue posible encontrar ninguna de estas estructuras. En todos los individuos del Grupo B se encontró disregulación de la jerarquía folicular con excesivo número de folículos preovulatorios de diámetro  $\geq 10$  mm medidos por ecografía. Los diámetros foliculares mínimo y máximo medidos por ecografía fueron 5,2 y 17,1 mm respectivamente. No se encontraron huevos intraoviductales.

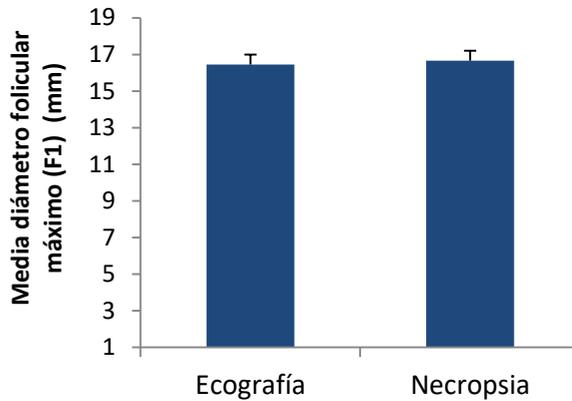
A partir del resultado de la exploración ecográfica se decidió finalizar el experimento en el Grupo B y proceder a la necropsia, en la que se practicó el recuento folicular, la medición directa de diámetros foliculares y la exéresis del oviducto.



**Figura 20. Media de folículos ováricos por individuo medidos mediante ecografía y necropsia en Grupo B.**

Recuento folicular mediante ecografía y tras necropsia para cada individuo en Grupo B, tratado con extracto glicoproteico de adenohipófisis de pavo (EGP), 144  $\mu\text{g}/24\text{ h}$  ( $n= 7$ ) durante 18 días en palomas hembra en condiciones de aislamiento visual respecto a otros individuos de la especie. Edad: Desconocida. Las columnas representan la media + DS del número de folículos ováricos por individuo. ANOVA.

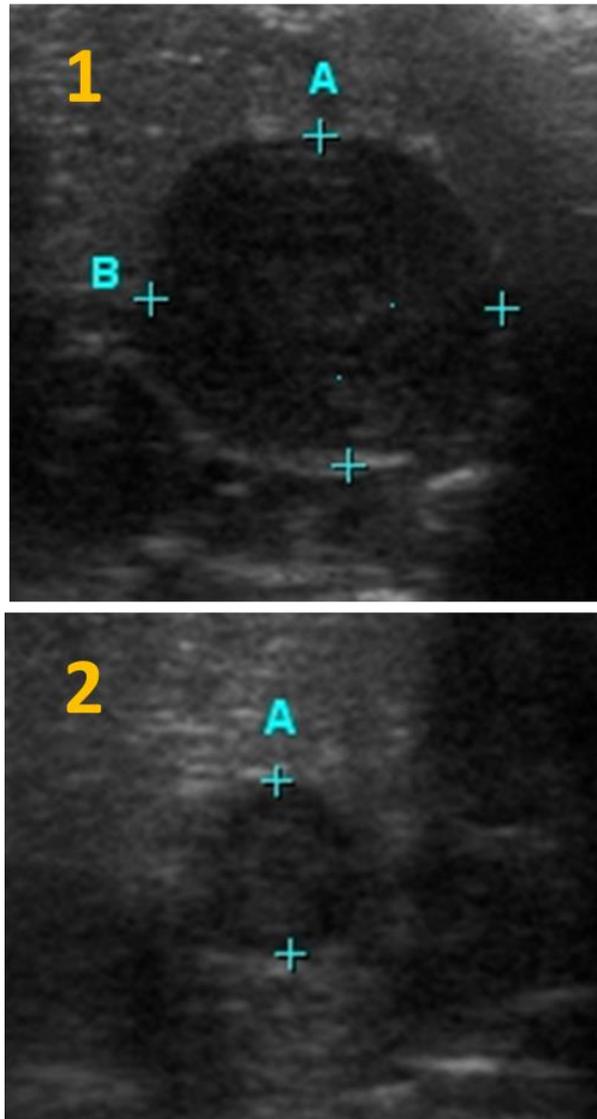
El recuento y medición folicular tras la necropsia, confirmó la hiperestimulación ovárica observada por ecografía. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el número medio de folículos ováricos contados mediante ecografía contados mediante en el recuento en necropsia (Figura 20). En dos de los individuos, los casos con menor recuento folicular (9 y 7 folículos respectivamente), este recuento fue idéntico para ambos métodos. En los demás casos, la presencia de abundantes folículos de tamaño semejante dificultó la identificación de cada uno de ellos e impidió un recuento ecográfico exacto. De estos resultados se predijo que, en circunstancias próximas a las fisiológicas, o incluso en el caso de un número de folículos preovulatorios comprendido entre 7 y 9, el recuento ecográfico permitiría una aproximación fiable del número de folículos ováricos presentes en cada individuo.



**Figura 21. Media del diámetro folicular máximo medido en cada individuo mediante ecografía y tras necropsia en Grupo B.**

Medición del fólculo diámetro máximo mediante ecografía y tras necropsia en cada individuo del Grupo B, tratado con extracto glicoproteico de adenohipófisis de pavo (EGP), 144  $\mu\text{g}/24\text{ h}$  ( $n= 7$ ) durante 18 días en palomas hembra en condiciones de aislamiento visual respecto a otros individuos de la especie. Edad: Desconocida. Las columnas representan la media + DS del diámetro folicular. ANOVA.

La medición fiable del diámetro folicular máximo en cada individuo mediante ecografía, permitiría la identificación de folículos F1 maduros y la inducción de su ovulación mediante administración de LH. Por este motivo, se comparó la medición del F1 mediante ecografía y durante la necropsia. La diferencia máxima entre los dos métodos de medición fue de 0,6 mm. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre ambos métodos respecto a este parámetro (Figura 21).



**Ilustración 36. Aspecto ecográfico de folículos ováricos en paloma tras administración de EGP**

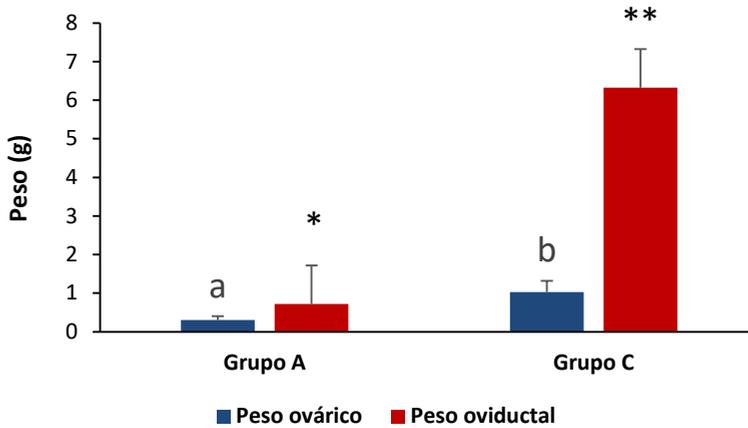
Imagen 1: Pueden apreciarse las capas concéntricas hiper e hipoeogénicas ("disk-like"). Distancia A = 13,6 mm. Dist B = 14,1 mm. Imagen 2: Folículo ovárico de 6,5 mm de diámetro.

Durante el experimento no tuvieron lugar oviposiciones. Sin embargo, en el momento de la necropsia se observó fluido denso compatible con vitelo en la cavidad celómica en los siete individuos del Grupo B. Al mismo tiempo, se observaron estructuras ováricas compatibles con folículos postovulatorios. El origen de este líquido de aspecto vitelino se atribuyó a ovulaciones internas sin captación oviductal del óvulo, con rotura del mismo y dispersión intraperitoneal del vitelo (Navara *et al.*, 2015). En ocasiones, se observó coagulación y organización del vitelo entre las vísceras y recubriendo la superficie hepática y peritoneal.

Al mismo tiempo, en todos los animales se observó un oviducto desarrollado y comprimido por la excesiva masa folicular. Los oviductos presentaban, además, improntas circulares coincidentes espacialmente con folículos ováricos, por lo que estas improntas se atribuyeron a la presión de los folículos sobre el oviducto. Estas alteraciones anatómicas por compresión pudieron ser la causa de la ausencia de captación de óvulos por parte del oviducto y su posterior desarrollo como huevos.

El día 18<sup>o</sup> del experimento se llevó a cabo la tercera exploración ecográfica en los Grupos C y Control. En ninguno de los individuos de estos grupos se observaron estructuras compatibles con folículos ováricos. En la necropsia, el diámetro folicular máximo en el Grupo control fue de 2,3mm, y de 4,6mm en el grupo tratado con eCG, con apariencia de mayor tamaño ovárico en este último grupo. Además, se apreciaron diferencias macroscópicas en el desarrollo oviductal entre el Grupo C y Control. Por este motivo, los ovarios y oviductos de estos dos grupos fueron disecados y pesados.

Tanto el peso medio ovárico como el oviductal fueron significativamente superiores en el grupo tratado con eCG que en el grupo Control.



**Figura 22. Peso ovárico y oviductal tras tratamiento con eCG en paloma**

Administración de 30UI de eCG (Grupo C) o suero fisiológico (Grupo A) cada 24 h durante 18 días en palomas hembra en condiciones de aislamiento visual respecto a otros individuos de la especie. Edad: Desconocida. Las columnas representan la media + DS del peso ovárico y oviductal para cada grupo de tratamiento. Diferentes letras o símbolos indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA,  $p \leq 0,001$ ).

El incremento del peso oviductal con escaso desarrollo folicular en el Grupo C (Figura 22) se atribuyó al efecto esteroideogénico de eCG y, fundamentalmente, a la secreción de estradiol por el efecto LH de eCG. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en los ensayos previos en codornices tratadas con LH IEX y eCG.

Los resultados de este ensayo demostraron la actividad gonadotropa de FSH y LH de pavo en paloma y la actividad esteroideogénica de eCG en esta especie.

En resumen, los resultados de este ensayo *in vivo* fueron los siguientes:

- La administración de 30UI de eCG/24h durante dieciocho días induce el desarrollo oviductal sin inducir desarrollo de folículos preovulatorios en paloma

- La administración de 144µg de EGP/24h induce el desarrollo de folículos preovulatorios. De ello se deduce que la FSH y LH de pavo activan sus receptores específicos en paloma

#### **4.6.2. Inducción del ciclo ovárico en paloma bravía mediante ccrFSH y eCG.**

El presente ensayo se planteó con la finalidad de valorar la actividad biológica de ccrFSH en combinación con eCG en hembras de paloma. Dado que en codorniz se demostró la necesidad de actividad FSH y LH para la inducción del desarrollo de folículos preovulatorios, en el presente ensayo no se estableció grupo de tratamiento con ccrFSH en exclusiva. Las dosis se administraron cada 48 h tras la evidencia de la eficacia de este protocolo en codorniz.

Se establecieron tres grupos experimentales:

- Grupo A (n=6): Control (Suero fisiológico)
- Grupo B (n=11): ccrFSH (0,7 µg) + 15 UI eCG/48 h
- Grupo C (n=7): ccrFSH (0,35 µg) + 15 UI eCG/48 h

La dosis de eCG se mantuvo fija en los dos grupos que recibieron tratamiento gonadotropo, y fue la misma que la utilizada en codorniz en el último experimento descrito para esta especie, aunque en paloma, por su mayor masa corporal, la dosis en función del peso fue menor. Se eligió también esta dosis por ser inferior a la dosis utilizada en el experimento anterior y que no resultó eficaz en la inducción del desarrollo de folículos preovulatorios en paloma. Esta reducción en la dosis se decidió teniendo en cuenta el efecto sinérgico de eCG y ccrFSH observado en codorniz.

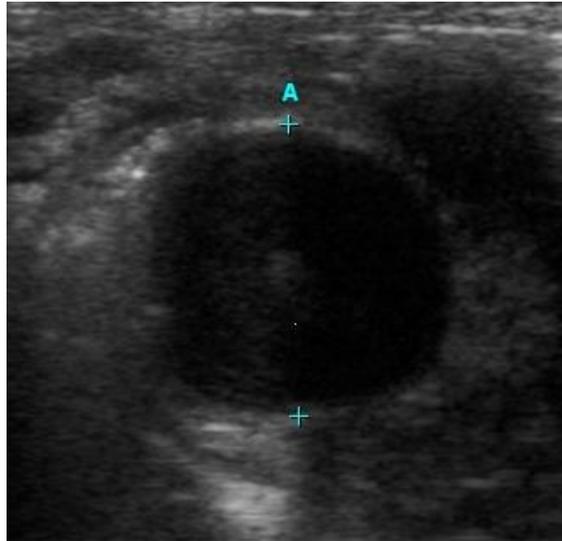
Se utilizaron dos dosis de ccrFSH (0,7 y 0,35 µg) cada 48 h. Estas dosis, también fueron inferiores a las utilizadas en el último experimento en

codorniz (en función del peso). Esta dosificación se eligió con la doble finalidad de intentar una aproximación al conocimiento de las dosis mínimas efectivas de estímulo gonadotropo y evitar el fenómeno de hiperestimulación ovárica en esta especie ya experimentado con la administración de EGP.

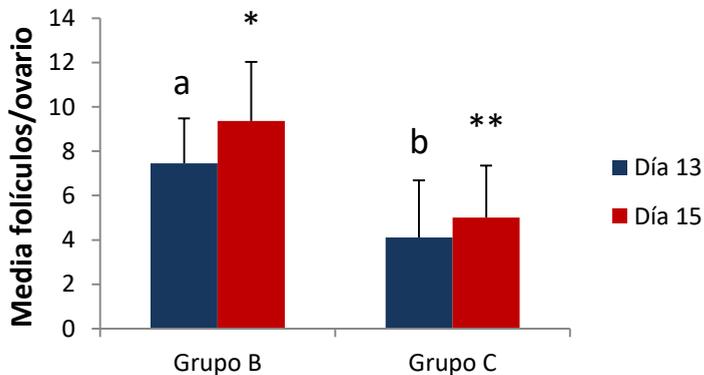
Se realizaron controles ecográficos el día del inicio del ensayo, así como los días 6<sup>o</sup>, 13<sup>o</sup> y 15<sup>o</sup>. En el Grupo Control, se realizó exploración ecográfica al inicio y al final del experimento.

En paloma mensajera, los folículos ováricos de diámetro superior a 6 mm son considerados como folículos jerárquicos (preovulatorios), mientras los folículos de diámetro superior a 15 mm son considerados folículos jerárquicos maduros (Goerlich *et al.*, 2010). Sin embargo, en la bibliografía consultada no se encontró una descripción de la evolución de folículos de tamaño intermedio (6-15 mm). Por tanto, durante los controles ecográficos se registró únicamente el diámetro de folículos  $\geq 10$  mm por ser considerados folículos preovulatorios y por la dificultad técnica en la visualización de folículos de diámetro inferior en presencia de abundantes folículos de gran tamaño. Además, las referencias citadas están basadas en palomas mensajeras con un peso medio de  $460 \pm 38$  g, mientras en nuestro caso, el peso medio de los ejemplares fue de  $250,3 \pm 20,5$  g. Esta diferencia de peso podría estar relacionada con el diámetro folicular.

En la exploración ecográfica realizada los días 1<sup>o</sup> y 6<sup>o</sup> de tratamiento no se identificaron folículos ováricos en ninguno de los individuos. El día 13<sup>o</sup>, en todos los individuos del Grupo B se encontraron folículos de diámetro  $\geq 10$  mm, y sólo en dos individuos del Grupo C no se evidenciaron folículos de este tamaño. El día 15<sup>o</sup>, se identificaron folículos de diámetro  $\geq 10$  mm en todos los individuos de ambos grupos.



**Ilustración 37.** Imagen ecográfica de folículo ovárico en paloma tras administración de ccrFSH + eCG (Grupo B). Día 13<sup>o</sup> de tratamiento. Diámetro folicular = 14,5 mm

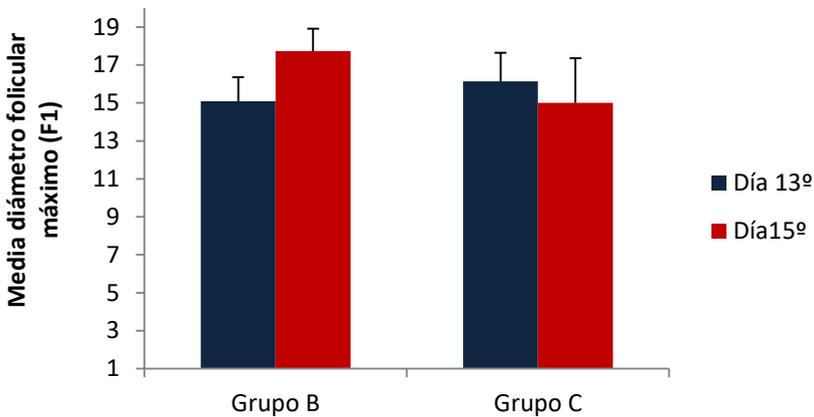


**Figura 23.** Folículos ováricos de diámetro  $\geq 10$  mm en palomas tras tratamiento combinado con ccrFSH (0,7 ó 0,35  $\mu\text{g}$ ) y 15 UI eCG/48 h

Administración de 0,7  $\mu\text{g}$  de ccrFSH + 15 UI de eCG (Grupo B) y 0,35  $\mu\text{g}$  de ccrFSH + 15 UI eCG (Grupo C) cada 48 h durante 15 días en palomas hembra. Individuos aislados visualmente de congéneres. Edad: desconocida. Peso: 250,3  $\pm$  20,5 g. Las columnas representan la media + DS del número de folículos por

individuo para cada grupo de tratamiento. Diferentes letras o símbolos indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA;  $p \leq 0,005$ ;  $n = 11$  en Grupo B, día 13<sup>o</sup>;  $n = 7$  en Grupo C, día 13<sup>o</sup>;  $n = 10$  en Grupo B, día 15<sup>o</sup>;  $n = 5$  en Grupo C, día 15<sup>o</sup>).

El número de folículos de diámetro  $\geq 10$  mm fue superior en el Grupo B con respecto al Grupo C tanto los días 13<sup>o</sup> como 15<sup>o</sup> de tratamiento (Figura 23). De este modo, se dedujo la relación directa entre la dosis de ccrFSH y el número de folículos preovulatorios.



**Figura 24. Media del diámetro folicular máximo en palomas tras tratamiento combinado con ccrFSH (0,7 ó 0,35  $\mu$ g) y 15 UI eCG/48 h**

Administración de 0,7  $\mu$ g de ccrFSH + 15 UI de eCG (Grupo B) y 0,35  $\mu$ g de ccrFSH + 15 UI eCG (Grupo C) cada 48 h durante 15 días en palomas hembra. Individuos aislados visualmente de congéneres. Edad: desconocida. Peso: 250,3  $\pm$  20,5 g. Las columnas representan la media + DS del número de folículos por individuo para cada grupo de tratamiento. (ANOVA;  $p \leq 0,005$ ;  $n = 11$  en Grupo B, día 13<sup>o</sup>;  $n = 7$  en Grupo C, día 13<sup>o</sup>;  $n = 10$  en Grupo B, día 15<sup>o</sup>;  $n = 5$  en Grupo C, día 15<sup>o</sup>).

La media del diámetro de los folículos de tamaño máximo (F1) no fue diferente entre los grupos B y C (Figura 24).

En la exploración ecográfica del día 13<sup>o</sup>, se descubrió un huevo intraoviductal en uno de los individuos (P19) del Grupo B (en proceso inicial de calcificación) en cuyo interior se observaron dos yemas de 15,7 y 15,3 mm de diámetro, producto de una ovulación doble (Christmas y Harms, 1982) y espontánea (Ilustración 38).

Observaciones anteriores realizadas por nuestro grupo permitieron comprobar que el diámetro del folículo F1 en las seis horas previas a la ovulación coincide con el tamaño de la yema *in ovo* tanto en gallina como en codorniz en ciclo de puesta natural. Las diferencias entre los diámetros de los folículos y las yemas de huevos intraoviductales medidos por ecografía fueron inferiores a 2 mm en el caso de gallinas y de 0,5 mm en codornices. Por lo tanto, se estimó que el diámetro de los folículos preovulatorios (inmediatamente antes de la ovulación) en la paloma P19 sería similar al de las yemas observadas en el huevo.



**Ilustración 38. Imagen ecográfica del huevo intraoviductal (dos yemas) en el individuo P19 durante la exploración del día 13° de tratamiento**

El día 13° de tratamiento se observaron folículos de diámetro superior a los de las yemas del individuo P19 en cinco palomas del Grupo B y cinco más en el Grupo C. Sin embargo, estos individuos no ovularon espontáneamente a juzgar por el único criterio aplicable en este experimento: la presencia de huevo intraoviductal. El número total de estos folículos fue de 14 en el Grupo B y 9 en el Grupo C.

Dado que la ovulación en aves es inducida por LH, y ante el número de folículos de diámetro  $\geq 15,3$  mm observados por ecografía y que no habían ovulado de forma espontánea, se decidió administrar una dosis de LH IEX (65  $\mu$ g), junto al tratamiento habitual, a los cuatro individuos del Grupo B con los folículos de mayor diámetro (18,1; 17,1; 16,9 y 16,5 mm) en la exploración ecográfica del día 13° con el objeto de inducir la ovulación. Esta

dosis se administró, aproximadamente, una hora tras la exploración ecográfica.

El día 15<sup>o</sup>, se comprobó que tres de las cuatro palomas tratadas con LH IEX habían ovulado. Se encontró un huevo intraoviductal en avanzado estado de calcificación en la paloma con folículo de 18,1 mm y dos huevos puestos por las palomas con folículos de 16,5 y 17,1 mm. En ninguno de los demás animales de ambos grupos se encontró imagen ecográfica compatible con ovulación (huevos en formación en cualquier tramo del oviducto). Este resultado sugirió la conveniencia y eficacia de la administración de LH como agente inductor de la ovulación en palomas en ciclo inducido.

La administración de LH IEX a estos cuatro animales alteró las condiciones generales del experimento. Por tanto, estos cuatro individuos no figuraron en el análisis del número de folículos preovulatorios del día 15<sup>o</sup>. Por este motivo, el número de individuos analizados este día fue de 5 en el Grupo B.

En todos los individuos tratados en los grupos B y C, el número de folículos de diámetro  $\geq 10$  mm excedió el número habitual de folículos preovulatorios (dos) en esta especie (Goerlich *et al.*, 2010) durante las exploraciones ecográficas del día 15<sup>o</sup>. Como ya se ha comentado, en el grupo tratado con menor dosis de ccrFSH (Grupo C), el número medio de folículos preovulatorios fue significativamente menor. Dado que en este experimento la dosis de eCG fue constante en ambos grupos, se puede concluir que la dosis de ccrFSH y, por tanto, la actividad FSH, está en directa relación con el número de folículos preovulatorios desarrollados durante el tratamiento de inducción del ciclo en paloma.

En el grupo Control no se encontraron folículos ováricos en ninguna de las exploraciones. Tampoco se produjeron oviposiciones.



### **4.6.3. Inducción del ciclo ovárico en paloma mediante tratamiento individualizado con ccrFSH y eCG**

En el anterior ensayo, la tendencia a la hiperestimulación ovárica y la variabilidad individual en la respuesta a las dosis utilizadas indicaron la necesidad de modificar el protocolo de inducción con el fin de obtener un desarrollo folicular lo más semejante posible al de esta especie en condiciones fisiológicas. Por otro lado, la administración de LH IEX se asoció a ovulación en folículos de diámetro  $\geq 16,5$  mm, mientras la ovulación espontánea sólo se observó solamente en un caso, a diferencia de lo ocurrido en los ensayos en codorniz.

Teniendo en cuenta estos resultados, y dado que uno de los objetivos de esta tesis fue la obtención de progenie viable en aves mediante la inducción del ciclo ovárico con gonadotropinas, el presente ensayo incluyó los siguientes objetivos y procedimientos:

- Inducción de desarrollo folicular lo más semejante posible al fisiológico en la especie
- Inducción de la ovulación
- Inseminación artificial
- Incubación de los huevos obtenidos mediante este protocolo

En el experimento anterior, la variación en el número de folículos preovulatorios dependió de la dosis de ccrFSH administrada. Sin embargo, no pudo descartarse un exceso de actividad LH (eCG) como causa de la tendencia a la hiperestimulación. Por este motivo, en el presente ensayo se redujo la dosis de eCG de 15 a 10 UI/48h y se mantuvo la menor dosis de ccrFSH (0,35  $\mu$ g/48h) que indujo desarrollo folicular con el menor grado de hiperestimulación ovárica. Además, se decidió reducir a la mitad la dosis de ccrFSH durante los seis primeros días de tratamiento (tres primeras dosis). La justificación de esta reducción inicial estuvo basada en los siguientes argumentos:

- Una disminución de la dosis de ccrFSH en las primeras fases del tratamiento podría inducir un menor reclutamiento inicial de folículos LWF y SYF, lo que podría resultar en un menor número de folículos seleccionados (a partir de SYF) en la fase de rápido crecimiento (jerárquicos/preovulatorios).
- Posteriormente, la administración de la dosis de ccrFSH aplicada en el Grupo C del anterior ensayo (0,35 µg/48h) induciría el reclutamiento de mayor número de folículos LWF/SYF, cuya actividad esteroideogénica es necesaria para la fase de rápido crecimiento folicular (SYF → Preovulatorio).
- En aves de reproducción estacional, los niveles circulantes de FSH previos a la puesta sufren un incremento gradual (Lincoln, 1980; Sakai e Ishii, 1986; Silverin *et al.*, 1997). Este incremento fisiológico podría promover la correcta estructura de la jerarquía folicular.

Además, en el anterior ensayo se evidenció variabilidad individual en la respuesta al tratamiento. El número de folículos de diámetro  $\geq 10$  mm varió entre 9 y 3 en el día 15<sup>o</sup> de tratamiento en el Grupo C (Figura 21), de modo que algunos individuos experimentaron un desarrollo folicular semejante al fisiológico mientras otros, tratados con la misma dosis, sufrieron un claro proceso de hiperestimulación.

Por los motivos expuestos, se decidió aplicar el siguiente protocolo de inducción:

- ccrFSH (0,17 µg) + 10 UI eCG/48 h durante los seis primeros días de tratamiento (tres dosis).
- ccrFSH (0,35 µg) + 10 UI eCG/48 h durante los ocho días siguientes (cuatro dosis).
- Individualización de la dosis de ccrFSH en función del número y tamaño de folículos observados en cada paloma desde el día 15<sup>o</sup> al 29<sup>o</sup> de tratamiento.

Los controles ecográficos se realizaron los días 1<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup>, 11<sup>o</sup> y cada 48 h durante el resto del ensayo. Se estableció un grupo control (n= 9) tratado con 200 µl de suero cada 24 h en el que se realizaron exploraciones ecográficas los días 1<sup>o</sup>, 11<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> y 29<sup>o</sup>.

Dado que el extracto glicoproteico hipofisario posee actividad LH de modo previo a su purificación e induce eficazmente la ovulación en gallina (Imai, 1973) y codorniz (Wakabayashi *et al.*, 1992), la inducción hormonal de la ovulación se llevó a cabo mediante la administración intramuscular de 80 µg de extracto glicoproteico adenohipofisario de pavo (EGP). La utilización de EGP frente a LH IEX fue debida a la escasa disponibilidad de este último preparado.

La administración de EGP se llevó a cabo en los individuos que presentaron folículos ováricos de diámetro  $\geq 15,5$  mm en la exploración ecográfica. En 2010, Goerlich *et al.* describieron como folículos maduros en paloma aquellos con un diámetro superior a 15 mm. En su trabajo, en el que uno de los parámetros analizados fue el diámetro del folículo restante (F1) tras la puesta del primer huevo, la mayoría de estos folículos presentaron un diámetro comprendido entre 18 y 22 mm (Goerlich *et al.*, 2010). Sin embargo, en las palomas objeto de inducción en nuestro anterior ensayo se observaron sólo dos folículos con diámetro  $\geq 18$  mm. Por otra parte, el individuo P19 del Grupo B, sufrió la ovulación espontánea de dos folículos de aproximadamente 15,7 y 15,3 mm.

En palomas, se desconoce el intervalo de tiempo en que un folículo F1 maduro es sensible al efecto ovulatorio de la LH antes de entrar en atresia. Sin embargo, trabajos experimentales en gallina indican que los folículos preovulatorios F1, en ausencia del estímulo ovulatorio de la LH, sufren atresia en un periodo de tiempo comprendido entre 15 y 48 horas (P. A. Johnson *et al.*, 1985; Opel y Nalbandov, 1961b; Sharp *et al.*, 1978).

Por estos motivos, se decidió inyectar EGP a cada individuo que presentara al menos un folículo de diámetro superior a 15,5 mm en la exploración ecográfica. De este modo, y ante la diversidad de folículos con diámetros superiores a esta medida encontrados en cada exploración y sometidos al estímulo LH del EGP, se podría realizar de modo empírico una aproximación al tamaño folicular mínimo y óptimo para inducir la ovulación en esta especie. La dosis de TPE se administró en un intervalo de entre media y una hora tras la ecografía e inmediatamente después de la inseminación artificial.

La inseminación artificial se llevó a cabo según lo descrito en el apartado correspondiente de "Material y Métodos". Siete machos se mantuvieron en jaulas contiguas a las de hembras (no tratadas), con contacto visual y auditivo entre los individuos, pero separados físicamente con la finalidad de impedir la cópula y la consiguiente pérdida del esperma (Cheng *et al.*, 2002; Sontakke *et al.*, 2004).

Cada hembra fue inseminada con el esperma obtenido de un sólo macho. Los siete machos disponibles se utilizaron aleatoriamente para las inseminaciones de las diferentes hembras. No se realizó un recuento espermático en ninguna de las muestras inseminadas dado el escaso volumen de las mismas y la inmediatez de la inseminación tras su recogida. Sin embargo, el esperma de estos machos fue valorado regularmente durante el experimento. En este periodo, los siete animales mostraron parámetros espermáticos dentro de los límites habituales en la especie mediante análisis de la concentración espermática en cámara de Neubauer y estimación subjetiva de motilidad (Cheng *et al.*, 2002).

Se intentó en todos los casos la inseminación intraoviductal (IO). Sin embargo, sobre todo en las primeras inseminaciones, no siempre fue posible la protrusión y observación del oviducto. En estos casos, se realizó inseminación intracloacal (IC).

La incubación se llevó a cabo a 37,5°C (Vatnik I., 1998) con humedad relativa del 55% los primeros 14 días y 70% en el resto, y con volteo automático cada 4 horas durante los primeros once días de incubación. A partir del sexto día de incubación, se practicaron ovoscopias seriadas para comprobar la existencia de embriones *in ovo*.

En las exploraciones ecográficas de los días 1º y 5º no se identificaron folículos ováricos en ninguno de los individuos. Sin embargo, durante la exploración del día 11º, se observaron de dos a cuatro folículos en doce de los catorce individuos tratados. El diámetro máximo de los mismos en cada individuo varió entre 7,3 y 18,6 mm,

La tabla expuesta a continuación (Tabla 18) recoge la siguiente información:

- Dosis de ccrFSH administradas a cada individuo a lo largo del ensayo.
- Folículos ováricos visibles por ecografía en cada individuo durante los muestreos realizados cada 48 h.
- Administraciones de extracto glicoproteico hipofisario de pavo (EGP) como agente inductor de la ovulación.
- Inseminaciones intracloacales e intraoviductales.
- Puestas de huevos y presencia de embriones *in ovo*.

**Tabla 18. Tabla descriptiva de muestreos durante tratamiento con ccrFSH y eCG en paloma**

Palomas hembra de edad desconocida mantenidas en condiciones de aislamiento visual respecto a individuos de su misma especie (n = 14). Peso: 257,7 ± 26,4 Tratamiento:

- 10 UI eCG + ccrFSH (0,17 µg) /48 h durante los días 1º-5º
- 10 UI eCG + ccrFSH (0,35 µg) /48 h los días 7º-13º
- 10 UI eCG + ccrFSH (0,35 o 0,7 µg) /48 h los días 15º-29º.

EGP = Administración intramuscular de 80 µg de extracto glicoproteico hipofisario de pavo.

X = Ausencia de folículos visibles en la exploración ecográfica

MFA = Masa folicular atrésica

IC = Inseminación intraocloal

IO = Inseminación intraoviductal

● = Huevo no embrionado   ● = Huevo embrionado   ● = Huevo embrionado y eclosionado

\*\* = Huevo con dos yemas

Individuo	P34										
Día de tratamiento	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31
Dosis ccrFSH	0,35µg										
Inducción ovulación			EGP		EGP		EGP		EGP	EGP	
Inseminación			IC		IC		IC		IC	IC	
Puesta				●		●		●		●	●
Diámetro folicular	8,9	13,6	17	14,8	17,1	14,7	16,8	15	17	16,5	
	6,1	12,1	15,6	13,8	13,6	12,3	14,5	13,5	15,1	14,1	
		9	11,4	7	10,9	7,8	10,3		10,6		
			7,2								

Individuo	P35										
Día de tratamiento	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31
Dosis ccrFSH	0,35µg	0,35µg	0,35µg	0,35µg	0,35µg	0,7µg	0,7µg	0,7µg	0,7µg	0,7µg	
Inducción ovulación		EGP		EGP							
Inseminación		IO		IO							
Puesta			●		●						
Diámetro folicular	13,5	17,4	15,4	18,9	7,5	9	10,1	8,7	X	X	
	9,2	12,8	14,4	13,3		8,6	9,2				
	5,7	9,7	11,9	7,1		5,1					

Individuo	P36										
Día de tratamiento	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31
Dosis ccrFSH	0,35µg	0,35µg	0,35µg	0,7µg							
Inducción ovulación						EGP					
Inseminación						IC					
Puesta							●				
Diámetro folicular	8,7	12,1	9	9,6	14,2	16,4	12,3	15,4	14,6	14,1	
	7,4	11,6		8	14,1	15,8	9,8	12,3	11,9	13,2	
					12	13,2			7,7		
						9,3					

Individuo	P37										
Día de tratamiento	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31
Dosis ccrFSH	0,35µg	0,7µg	0,7µg	0,7µg							
Inducción ovulación				EGP	EGP					EGP	
Inseminación				IC	IC					IO	
Puesta					●	●					●
Diámetro folicular	9,1	12,2	14,3	16,2	17,9	14,9	10,7	9,9	13,8	16,3	
	7,7	9,4	11,6	14,9	13,8	10,8	8,3		10,5	13	
				10,5	12,1	9,7				11,4	

Individuo	P38										
Día de tratamiento	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31
Dosis ccrFSH	0,35µg										
Inducción ovulación					EGP	EGP					
Inseminación					IC	IC					
Puesta						●	●				
Diámetro folicular	X	8,9	11,4	15,6	17,2	18,1	13,5	13,1	14,1	14	
		7,1	10,3	13,7	15,7	15,8	11,3	10,9	13,8	10,6	
				10,2	13,9	10,1	9	9,7	11,1	9,2	
			9,1								

Individuo	P39										
Día de tratamiento	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31
Dosis ccrFSH	0,35µg										
Inducción ovulación		EGP	EGP	EGP		EGP	EGP	EGP	EGP		
Inseminación		IC	IC			IO					
Puesta			●	●			●				
Diámetro folicular	13,7	16,3	16,1	16,5	15,1	16,8	15,7	15,5	16,5	15,1	
	12,5	14,9	15,1	14,8	15	16,6	13,2	15,4	14,7	13,7	
			13,3	13,2	12,9	14,4	13,1	15,4	10,2		
			11				11,3				

Individuo	P40										
Día de tratamiento	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31
Dosis ccrFSH	0,35µg	0,35µg	0,35µg	0,7µg							
Inducción ovulación							EGP	EGP	EGP		
Inseminación							IO	IO	IO		
Puesta								●	●		
Diámetro folicular	10,1	13,7	12,2	13,9	13,1	15,4	17,6	16,3	17,5	14,8	
	9,6	10,8	8,8	12,5	9,7	12,4	13,8	14,9	15,3	11,6	
	8,2				8,1	10,6	12,9	12,3	12,9	11,2	
					7,2	9,9					

Individuo	P41										
Día de tratamiento	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31
Dosis ccrFSH	0,35µg	0,35µg	0,7µg								
Inducción ovulación									EGP		
Inseminación									IC		
Puesta										**●	
Diámetro folicular	X	X	X	X	X	X	9,7	13,8	16,6	11,2	
							6,1	13,1	16	9,6	
								9,4	13,8	7,1	
								8			

Individuo	P42										
Día de tratamiento	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31
Dosis ccrFSH	0,35µg										
Inducción ovulación					EGP			EGP			
Inseminación					IC			IO			
Puesta						●			●		
Diámetro folicular	7,5	9,3	9,5	13,7	16	14,4	14,9	17,5	13,1	14,1	
	6,5	8,9	7,4	11,3	15,1	12,5	11	14,8	11,5	12,8	
	5,9			9,2	12,7		9,7	12,8	9,4	10	
					10,5						

Individuo	P43										
Día de tratamiento	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31
Dosis ccrFSH	0,35µg	0,35µg	0,7µg								
Inducción ovulación					EGP			EGP	EGP	EGP	
Inseminación					IO			IO	IO	IO	
Puesta						●			●		●
Diámetro folicular	7,3	9,9	11,9	14,4	16,9	13,2	15,3	17,5	15,9	16,7	
	5,6	6,8		7,3	10,9	12,1	14,1	15,1	14,9	15,3	
				6,3	9,5	9,6	12,7	12,8	13,4	13,6	
						6,1	9,9	7,2		10,4	

Individuo	P44										
Día de tratamiento	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31
Dosis ccrFSH	0,35µg										
Inducción ovulación			EGP				EGP				
Inseminación			IC				IO				
Puesta				●				●			
Diámetro folicular	8,1	13,7	17,1	15,3	14,7	13,5	16,8	12,6	14,3	13,1	
	7,2	11,8	15,3	12,1	13,8	13,2	15,7	10,5	13,9	9,3	
		9,3	12,9	11,3	13,1	12,4	14,2	9,4	10,5		
				10,7	11,2	11	10,9	8,2	9,3		
				9,4	10,2	10,6					

Individuo	P45										
Día de tratamiento	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31
Dosis ccrFSH	0,35µg	0,35µg	0,35µg	0,35µg	0,35µg	0,35µg	0,7µg	0,7µg	0,7µg	0,7µg	
Inducción ovulación			EGP								
Inseminación			IO								
Puesta				●							
Diámetro folicular	12,9	14,9	18,5	14,5	9,6	12,1	8	MFA	X	X	
	7,3	10,2	12,8	13,9	7,4	9,2					
		9,9	12,3		6	7,7					

Individuo	P46										
Día de tratamiento	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31
Dosis ccrFSH	0,35µg	0,35µg	0,35µg	0,35µg	0,7µg	0,7µg	0,7µg	0,7µg	0,7µg	0,7µg	
Inducción ovulación	EGP		EGP				EGP	EGP		EGP	
Inseminación	IO		IO								
Puesta		**●		●							
Diámetro folicular	18,6	15,1	17,2	7,4	8,6	14,7	17	16,8	14,3	17,6	
	18,3	13,2	14,7	6,2		12,4	14,6	13,3	10,9	14,1	
	14,1	11,6	13,8			6,1	10,1			11,1	
	11,6	10,2	12,5								
			8,9								

Individuo	P47										
Día de tratamiento	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31
Dosis ccrFSH	0,35µg	0,7µg	0,7µg								
Inducción ovulación		EGP			EGP			EGP			
Inseminación		IC			IO			IO			
Puesta			●			●			●		
Diámetro folicular	14,3	16,9	11,6	14,1	16,8	11,6	14,5	17,4	X	10,7	
	11,6	14,5	6,2	9,3	13,1	9,1	11,3	14,6		9,9	
	8,7	12,9		8,1	12		10,3	12,1		7,3	
		8,3									

En la exploración ecográfica del día 13<sup>o</sup> se observaron folículos de diámetro  $\geq 10$  mm en diez de las catorce palomas tratadas y en número de 1-4 por individuo. El número medio de estos folículos en el grupo tratado fue inferior ( $1,57 \pm 1,22$ ) al observado el correspondiente día de tratamiento en el Grupo C del anterior ensayo ( $4,11 \pm 2,57$ ; Figura 21).

En el muestreo del día 15<sup>o</sup> se encontraron folículos de diámetro  $\geq 10$  mm en nueve individuos. La media por individuo ( $1,5 \pm 1,34$ ) también fue inferior a la observada en el Grupo C ( $5 \pm 2,34$ ; Figura 21) del experimento anterior y correspondiente al mismo día de tratamiento.

Salvo en el individuo P44 (días 19<sup>o</sup> y 21<sup>o</sup>) no se observaron más de cuatro folículos  $\geq 10$  mm en la exploración de ningún individuo a lo largo del ensayo.

En nueve de los 14 animales tratados se incrementó a  $0,7 \mu\text{g}/48$  h la dosis de ccrFSH en algún momento del experimento. Este incremento se realizó el día 15<sup>o</sup> en P41 por no apreciarse folículos en la ecografía, y en P43 por presentar escaso desarrollo folicular. También se aplicó esta dosis el día 17<sup>o</sup> a

P40 y P36 por el escaso desarrollo folicular observado. En el resto de los casos se aplicó en diferentes días por la ausencia de folículos preovulatorios tras un desarrollo folicular completo con ovulación y puesta de huevos.

Durante la exploración ecográfica del día 11<sup>o</sup>, se encontraron dos folículos de 18,6 y 18,3 mm en el individuo P46. Tras la exploración, se practicó inseminación intraoviductal y se administró la correspondiente dosis de EGP. Cuarenta y cuatro horas después, se encontró un huevo con dos yemas puesto por esta paloma. Tras seis días de incubación, se comprobó mediante ovoscopia la presencia de dos embriones *in ovo*. Ambos embriones manifestaron signos vitales (latido cardíaco y movimiento) hasta el día 12<sup>o</sup> de incubación.



**Ilustración 40. Ovoscopia durante el 6<sup>o</sup> día de incubación del huevo con dos yemas puesto por el individuo P46 el día 13<sup>o</sup> de tratamiento**  
Se pueden apreciar las dos estructuras embrionarias.

Durante el experimento, se administró un total de 41 dosis de EPG. En 32 casos (78%), la oviposición tuvo lugar en el plazo de 44 horas, y en dos ocasiones se evidenciaron dos yemas en el interior del huevo. De este modo, un mínimo de 34 folículos ovularon tras administración de EGP, aunque no pueden descartarse más ovulaciones intraabdominales sin formación de huevo.

El diámetro folicular mínimo en el que se observó oviposición tras administración de EGP fue de 16 mm. El número de oviposiciones tras administración de EGP fue independiente del diámetro folicular cuando este fue  $\geq 16$  mm.

No se observó ninguna puesta de huevos ni se encontraron huevos intraoviductales en palomas que no hubieran recibido la dosis de EGP. Sin embargo, la ausencia de un grupo experimental con el mismo tratamiento en el que no se administrara EGP como agente inductor de la ovulación, impide demostrar que las ovulaciones observadas fueran inducidas por EGP.

El incremento del diámetro del folículo de mayor tamaño con respecto al folículo de mayor tamaño observado 48 horas antes para cada paloma varió entre 1,6 y 3,5 mm en folículos  $\geq 15$  mm. Aunque el folículo de diámetro máximo medido en una exploración determinada no pueda identificarse con seguridad con el observado en la exploración previa, resulta verosímil que, en la mayoría de los casos, se trataría del mismo folículo. De este modo, en folículos en los que cabría esperar un crecimiento hasta tamaño ovulatorio y ovulación en el curso de las 24-48 h tras la ecografía, no se dio el proceso de ovulación espontánea. Son ejemplos de esta circunstancia el folículo de 15,4mm en P36 el día 25º, y el de 15,3mm en P44 el día 17º. Cuarenta y ocho horas después, los folículos de diámetro máximo hallados en la ecografía en estos individuos fue menor al medido previamente y no se encontraron huevos intraoviductales u oviposiciones en estos animales. El destino de

estos folículos aparentemente destinados a ovulación no pudo determinarse. Existe la posibilidad de que sufrieran un proceso de atresia ante la falta de estímulo LH que indujera su ovulación (P. A. Johnson *et al.*, 1985), aunque tampoco puede descartarse la ovulación interna sin captación del óvulo por el oviducto (Navara *et al.*, 2015).

Este fenómeno que denominamos “folículo perdido”, se dio también tras la administración de EGP en varios casos en folículos considerados F2 por su tamaño. Como ejemplos, en la Tabla 19 se muestran los casos de las palomas P40 y P42 en fragmentos seleccionados a partir de la Tabla 21. Se superponen flechas de trazo discontinuo que indican la supuesta evolución de algunos folículos.

**Tabla 19. Evolución ecográfica de folículos no ovulados**

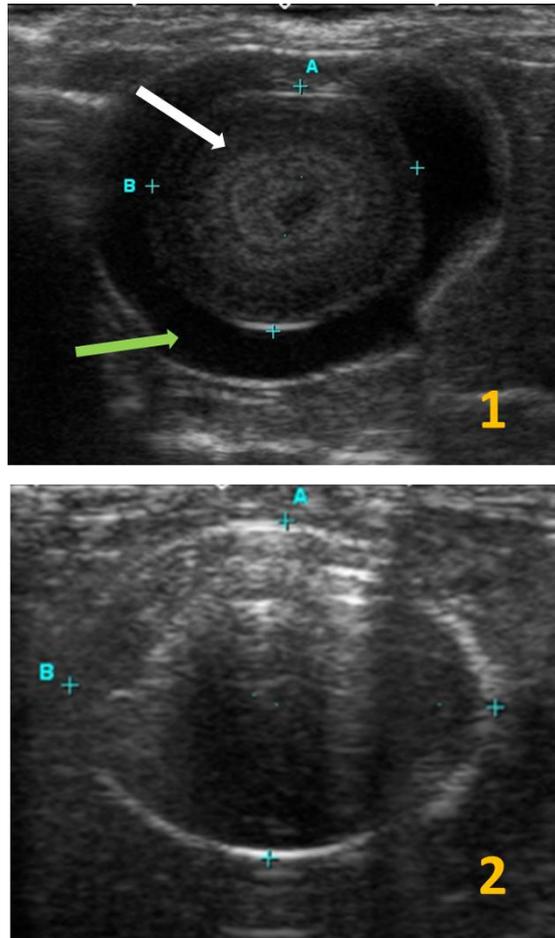
P40					
21	23	25	27	29	31
0,7µg	0,7µg	0,7µg	0,7µg	0,7µg	
	EGP	EGP	EGP		
	IO	IO	IO		
					
15,4	17,6	16,3	17,5	14,8	
12,4	13,8	14,9	15,3	11,6	
10,6	12,9	12,3	12,9	11,2	
9,9					

P42			
15	17	19	21
0,35µg	0,35µg	0,35µg	0,35µg
		EGP	
		IC	
			
9,5	13,7	16	14,4
7,4	11,3	15,1	12,5
	9,2	12,7	
		10,5	

En el caso de P40, el folículo de 15,3 mm del día 27<sup>o</sup>, que en la ecografía del día 29<sup>o</sup> debiera aparecer con un diámetro superior, no es detectado. En el caso de P42, sucedió lo mismo con el folículo de 15,1 mm del día 19<sup>o</sup>. Sin embargo, en estos dos casos, se añade una tercera hipótesis para explicar su ausencia en la exploración 48 horas tras la administración de EGP: la posibilidad de atresia inducida por exceso de estímulo LH tanto en folículos F1 inmaduros como en folículos F2 (Gilbert *et al.*, 1981).

Los días 16<sup>o</sup> y 22<sup>o</sup> se realizaron exploraciones ecográficas veinticuatro horas tras la administración de EGP en las palomas P34, P39, P44, P45 y P46 (día 16<sup>o</sup>) y en P36, P38 y P39 (día 22<sup>o</sup>) con la intención de obtener imágenes ecográficas de huevos intraoviductales en estadios precoces de calcificación, ya que en estado de calcificación avanzada (a partir de 40 h tras administración de EPG), las estructuras del interior del huevo no son visibles por ecografía. En los ocho casos (100% ovulación tras EGP), la diferencia entre el diámetro máximo del folículo observado el día anterior y el diámetro de la yema fue siempre inferior a 0,8 mm.



#### Ilustración 41. Imagen ecográfica de huevos intraoviductales

Imagen 1: Huevo intraoviductal 24 h tras la administración de EGP en individuo P38 el día 21 de tratamiento al observarse folículo de diámetro máximo de 18,1 mm. Se aprecia la yema (flecha blanca) rodeada por albumen (flecha verde). Distancia A = 17,4; B = 17,9 mm. Imagen 2: Huevo intraoviductal en avanzado estado de calcificación 42 h tras administración de EGP. Distancia A = 27,2 mm; B = 34,7 mm. No es posible diferenciar estructuras definidas dentro del huevo.

Durante el experimento, todas las palomas tratadas con gonadotropinas pusieron huevos. El número medio de huevos puestos por paloma fue de

2,28 ± 1,05, con un máximo de 5 en P34 y un solo huevo en tres individuos (P36, P41 y P35).

Se obtuvo un total de 32 huevos a lo largo del experimento. En once de ellos (34,3%) se evidenció presencia de embrión mediante ovoscopia realizada en el día sexto de incubación.

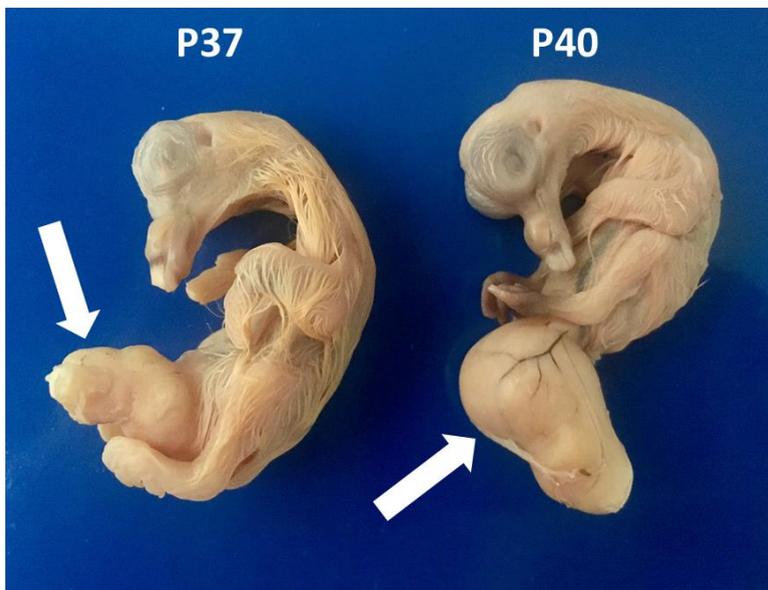
Diez de los quince huevos (66,6%) en los que se había practicado inseminación intraoviductal (IO), resultaron embrionados. En cambio, en sólo uno de los dieciséis huevos (6,25%) puestos tras inseminación intracloacal (IC) se diagnosticó presencia embrionaria. Estos datos indican una superior eficacia de la inseminación intraoviductal con respecto a la intracloacal y contrastan con los resultados obtenidos por Sontakke *et al.* (2004): 45% de huevos fecundados tras inseminación intracloacal. La causa de esta diferencia podría estar basada en la técnica de la inseminación. Sin embargo, otros autores, describen mayores tasas de fertilización mediante inseminación intraoviductal en diferentes especies de aves (Blanco *et al.*, 2002; Lierz *et al.*, 2013; Sontakke *et al.*, 2004).

La incubación de los huevos se llevó a cabo en dos incubadoras idénticas (incubadoras A y B) en las que se repartieron los huevos aleatoriamente desde el comienzo de la incubación. La temperatura de incubación programada en ambas fue de 37,5°C (Vatnik I., 1998). Posteriormente a la realización del presente ensayo, aparecieron en la bibliografía nuevos datos y parámetros de incubación en huevos de paloma con temperaturas más elevadas, de 38,2°C (Zhao *et al.*, 2017), 38,1°C (Dong, X.I. *et al.*, 2013) y 37,8°C (Lukasiewicz M., 2014).

En la incubadora A, dos de los embriones desarrollados llegaron al día 20º de incubación manifestando signos vitales (movimiento detectado por ovoscopia), sin embargo, el día 21º cesaron dichos signos. Tras la apertura del huevo, se encontraron ambos embriones muertos y con abundante saco

vitelino sin reabsorber. Estos embriones correspondieron a los huevos puestos por las palomas P37 (día 19°) y P40 (día 25°).

En la incubación natural, los huevos de paloma eclosionan entre el día 18° y 19° (Vatnik I., 1998). Tanto el retardo en la eclosión como la persistencia de saco vitelino sin reabsorber están relacionados con temperaturas de incubación inferiores a las adecuadas para la especie (Ipek *et al.*, 2014; Olson *et al.*, 2006).



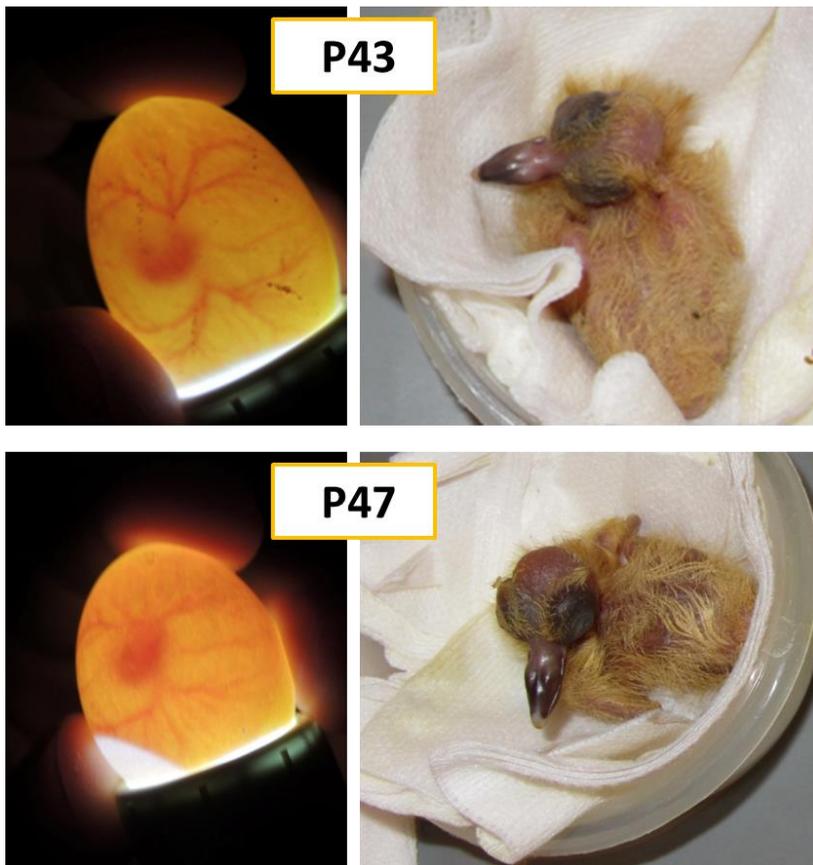
**Ilustración 42. Aspecto macroscópico de embriones muertos in ovo tras 21 días de incubación**

Imagen de los embriones P37 y P40 muertos tras 21 días de incubación con temperatura de 36,9°. Las flechas indican saco vitelino no reabsorbido, fenómeno atribuido a temperatura de incubación insuficiente.

Por estos motivos, se comprobó la temperatura en el interior de la incubadora A mediante la colocación de tres termómetros (clínicos) en diferentes puntos de la misma. Esto permitió observar durante dos días que

la temperatura máxima alcanzada fue de 36,9 grados, a causa, probablemente, de un fallo en el termostato.

La comprobación en la incubadora B mostró una temperatura de 37,5°C, según estaba programada. El día 19º de incubación, eclosionaron en esta incubadora dos huevos correspondientes a las palomas P43 (día 27º) y P47 (día 27º). Fueron los dos pichones de esta especie nacidos en este ensayo.



**Ilustración 43. Imagen ovoscópica y fotografía de los pichones nacidos durante este ensayo**

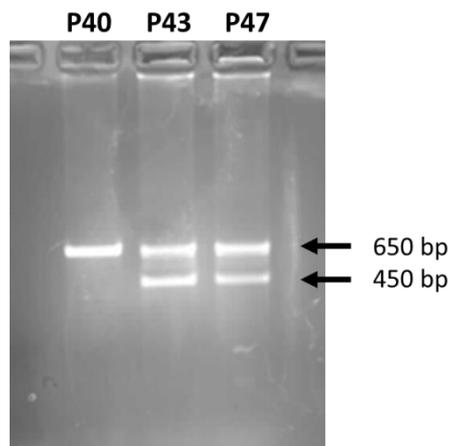
Las ovoscopias fueron realizadas el día 6º de incubación. Las fotografías de los embriones fueron tomadas el 5º día tras la eclosión. Los embriones y pichones corresponden a los huevos puestos por P43 y P47 el día 27º del experimento.

El peso al nacimiento de los pichones fue de 12,4 g (P43) y 10,9 g (P47). El pichón obtenido de P47 murió súbitamente a los 24 días de edad tras una ingesta copiosa. El día previo a su muerte su peso era de 152 g.

El pichón obtenido de P43 permanece vivo y en aparente estado de salud en el momento redactar esta tesis. Su edad es de cinco años y nueve meses.

Se realizó el sexado tanto de los pichones nacidos como de los dos embriones muertos *in ovo* tras 21 días de incubación. El proceso se realizó según la metodología descrita en Material y Métodos (Sexado molecular en aves). La separación por electroforesis de los productos de PCR amplificados con los cebadores 2550F y 2718R, reveló bandas de 650 y 450 pares de bases para los dos pichones eclosionados y para el embrión del huevo puesto por P37 (día19<sup>o</sup>), y una sola banda de 650 pares de bases para el huevo puesto por P40, coincidiendo con lo descrito en la literatura (Vucicevic *et al.*, 2012)

Por tanto, los pichones nacidos de P43 y P47 y el embrión de P37 fueron identificados como hembras, mientras que el embrión de P40 fue identificado como macho.



**Ilustración 44. Sexado molecular de pichones. Electroforesis en gel de agarosa**

Bandas electroforéticas de 650 y 450 pares de bases obtenidas tras amplificación por PCR con los oligonucleótidos 2550F y 2718R. P43 y P47= Hembras. P40= Macho.

La evidencia de la existencia individuos con diferente sexo nacidos tras inducción con ccrFSH/eCG se consideró relevante para la aplicación de los procedimientos de estimulación ovárica en otras especies, dado que las condiciones hormonales pueden alterar la relación entre el número de machos y hembras de las crías nacidas en una puesta. Este fenómeno está vinculado a la heterocigosis en las hembras en aves (cromosomas Z y W) (Alonso-Alvarez, 2006; Goerlich-Jansson *et al.*, 2013).

La obtención de progenie tras la aplicación del presente protocolo demuestra que la aplicación directa de gonadotropinas puede sustituir la secuencia de eventos ambientales (y los fisiológicos subsiguientes) que determinan los ciclos reproductivos de aves en su ambiente natural y que, con elevada frecuencia, no se dan en condiciones de cautiverio.

De este modo, esta tecnología, tras diversos desarrollos experimentales para su perfeccionamiento, podría resultar en una herramienta valiosa para su aplicación en aves en peligro de extinción que no desarrollan ciclos reproductivos espontáneos en cautividad.

En resumen, los resultados de este ensayo *in vivo* fueron las siguientes:

- La administración de tratamiento combinado de ccrFSH y eCG según el protocolo descrito en el presente ensayo, junto a la inducción de la ovulación mediante EGP, indujo la puesta de huevos en el 100% de las palomas tratadas
- La inseminación artificial tras este tratamiento y la incubación de los huevos resultó en el nacimiento de dos pichones

## **CONCLUSIONES**



1. ccrFSH, una proteína monomérica compuesta por la unión covalente de las subunidades  $\beta$  y  $\alpha$  de la FSH de codorniz mediante un péptido de unión formado por los 28 aminoácidos C-terminales de la HCG y 6 residuos histidina, se expresa y secreta eficazmente en células de ovario de hámster chino (CHO).
2. ccrFSH induce la secreción de progesterona en las células de la granulosa de folículos jerárquicos inmaduros (F5) de gallina en ensayo *in vitro*.
3. ccrFSH induce el desarrollo de folículos ováricos de diámetro comprendido entre 1 y 5 mm en codornices reproductivamente inmaduras.
4. La administración conjunta de ccrFSH y LH de pavo o de ccrFSH y eCG, induce desarrollo folicular ovárico completo y la puesta de huevos en codornices reproductivamente inmaduras.
5. La administración conjunta de ccrFSH y eCG induce el desarrollo folicular completo en palomas.
6. La inducción de la maduración folicular con ccrFSH y eCG y las subsiguientes ovulaciones tras administración de extracto glicoproteico de adenohipófisis de pavo (EGP) resultan en óvulos fertilizables y puesta de huevos de calidad suficiente para el desarrollo embrionario completo y el nacimiento de progenie viable en palomas.



## **BIBLIOGRAFÍA**



- Alonso-Alvarez, C. (2006). Manipulation of primary sex-ratio: An updated review *Avian and Poultry reviews*, 17(1), 1-20.
- Ando, H., & Ishii, S. (1994). Molecular cloning of complementary deoxyribonucleic acids for the pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit and luteinizing hormone beta-subunit precursor molecules of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Gen Comp Endocrinol*, 93(3), 357-368. doi:10.1006/gcen.1994.1040
- Apperson, K. D., Bird, K. E., Cherian, G., & Lohr, C. V. (2017). Histology of the Ovary of the Laying Hen (*Gallus domesticus*). *Vet Sci*, 4(4). doi:10.3390/vetsci4040066
- Armstrong, D. G. (1994). The effect of LH, FSH and pregnant mares' serum gonadotrophin on ornithine decarboxylase activity in thecal and granulosa tissue during follicular growth and atresia in laying hens (*Gallus domesticus*). *J Reprod Fertil*, 100(1), 273-278.
- Barfield, R. J. (1971). Gonadotrophic hormone secretion in the female ring dove in response to visual and auditory stimulation by the male. *J Endocrinol*, 49(2), 305-310.
- Bausek, N., Waclawek, M., Schneider, W. J., & Wohlrab, F. (2000). The major chicken egg envelope protein ZP1 is different from ZPB and is synthesized in the liver. *J Biol Chem*, 275(37), 28866-28872.
- Bedecarrats, G. Y., & Kaiser, U. B. (2003). Differential regulation of gonadotropin subunit gene promoter activity by pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in perfused L beta T2 cells: role of GnRH receptor concentration. *Endocrinology*, 144(5), 1802-1811. doi:10.1210/en.2002-221140
- Ben-Menahem, D. (2018). Preparation, characterization and application of long-acting FSH analogs for assisted reproduction. *Theriogenology*, 112, 11-17. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.08.020
- Bennett, E. (2002). Hormonal stimulation of ovarian development, ovulation and oviposition in Japanese quail. (PhD), Massey University, Palmerston North.
- Bentley, G. E., Tsusui, K., & Wingfield, J. C. (2007). Endocrinology of Reproduction. In B. G. M. Jamieson (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Birds* (Vol. 6A, pp. 181-242). Enfield, NH, USA: Science Publishers.

- Blanco, J. M., Gee, G., Wildt, D. E., & Donoghue, A. M. (2000). Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. *Biol Reprod*, 63(4), 1164-1171.
- Blanco, J. M., Gee, G. F., Wildt, D. E., & Donoghue, A. M. (2002). Producing progeny from endangered birds of prey: treatment of urine-contaminated semen and a novel intramagnal insemination approach. *J Zoo Wildl Med*, 33(1), 1-7. doi:10.1638/1042-7260(2002)033[0001:ppfebo]2.0.co;2
- Blue, B. J., Pickett, B. W., Squires, E. L., McKinnon, A. O., Nett, T. M., Amann, R. P., & Shiner, K. A. (1991). Effect of pulsatile or continuous administration of GnRH on reproductive function of stallions. *J Reprod Fertil Suppl*, 44, 145-154.
- Bohr, L. W., Ogasawara, F. X., & Lorenz, F. W. (1964). Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds. II. Transport of spermatozoa in the fowl oviduct. *J Reprod Fertil*, 8, 49-58.
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol*, 326, 245-254.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Bronneberg, R. G., & Taverne, M. A. (2003). Ultrasonography of the female reproductive organs in farmed ostriches (*Struthio camelus* spp.). *Theriogenology*, 60(4), 617-633.
- Brooks, S. A. (2004). Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use: implications of choice of expression system. *Mol Biotechnol*, 28(3), 241-255. doi:10.1385/mb:28:3:241
- Bujo, H., Hermann, M., Kaderli, M. O., Jacobsen, L., Sugawara, S., Nimpf, J., Schneider, W. J. (1994). Chicken oocyte growth is mediated by an eight ligand binding repeat member of the LDL receptor family. *Embo j*, 13(21), 5165-5175.
- Burrows, W. H., & Quinn, J. P. (1938). Effective Dosages of Undiluted Semen in Artificial Insemination of Chickens. *Poultry Science*, 17(2), 131-135. doi:10.3382/ps.0170131

- Bush, M., Wildt, D. E., Kennedy, S., & Seager, S. W. (1978). Laparoscopy in zoological medicine. *J Am Vet Med Assoc*, 173(9), 1081-1087.
- Butnev, V. Y., May, J. V., Shuai, B., Tran, P., White, W. K., Brown, A., Bousfield, G. R. (2015). Production, purification, and characterization of recombinant hFSH glycoforms for functional studies. *Mol Cell Endocrinol*, 405, 42-51. doi:10.1016/j.mce.2015.01.026
- Calisi, R. M., Diaz-Munoz, S. L., Wingfield, J. C., & Bentley, G. E. (2011). Social and breeding status are associated with the expression of GnIH. *Genes Brain Behav*, 10(5), 557-564. doi:10.1111/j.1601-183X.2011.00693.x
- Calisi, R. M., Rizzo, N. O., & Bentley, G. E. (2008). Seasonal differences in hypothalamic EGR-1 and GnIH expression following capture-handling stress in house sparrows (*Passer domesticus*). *Gen Comp Endocrinol*, 157(3), 283-287. doi:10.1016/j.ygcen.2008.05.010
- Callewaert, L., & Michiels, C. W. (2010). Lysozymes in the animal kingdom. *J Biosci*, 35(1), 127-160.
- Calvo, F. O., & Bahr, J. M. (1983). Adenylyl cyclase system of the small preovulatory follicles of the domestic hen: responsiveness to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Biol Reprod*, 29(3), 542-547.
- Calvo, F. O., Keutmann, H. T., Bergert, E. R., & Ryan, R. J. (1986). Deglycosylated human follitropin: characterization and effects on adenosine cyclic 3',5'-phosphate production in porcine granulosa cells. *Biochemistry*, 25(13), 3938-3943.
- Carillo, S., Mittermayr, S., Farrell, A., Albrecht, S., & Bones, J. (2017). Glycosylation Analysis of Therapeutic Glycoproteins Produced in CHO Cells. *Methods Mol Biol*, 1603, 227-241. doi:10.1007/978-1-4939-6972-2\_15
- Carre, W., Wang, X., Porter, T. E., Nys, Y., Tang, J., Bernberg, E., . . . Cogburn, L. A. (2006). Chicken genomics resource: sequencing and annotation of 35,407 ESTs from single and multiple tissue cDNA libraries and CAP3 assembly of a chicken gene index. *Physiol Genomics*, 25(3), 514-524. doi:10.1152/physiolgenomics.00207.2005
- Cartee, R. E., Rumph, P. F., Roland, D., & Steele, D. E. (1992). Ultrasonographically detectable ring structure in avian (*Gallus gallus*) egg yolks. *Anat Histol Embryol*, 21(1), 57-64.

- Carvalho, P. D., Hackbart, K. S., Bender, R. W., Baez, G. M., Dresch, A. R., Guenther, J. N., . . . Fricke, P. M. (2014). Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: a preliminary study. *Theriogenology*, *82*(3), 481-489  
doi:10.1016/j.theriogenology.2014.05.011
- Chalana, R. K., & Guraya, S. S. (1979). Morphological and histochemical observations on the ovarian surface epithelium during the reproductive cycle of crow (*Corvus splendens*) and myna (*Acridotheres tristis*). *Acta Morphol Neerl Scand*, *17*(1), 65-72.
- Chauvigne, F., Gonzalez, W., Ramos, S., Ducat, C., Duncan, N., Gimenez, I., & Cerda, J. (2018). Seasonal-and dose-dependent effects of recombinant gonadotropins on sperm production and quality in the flatfish *Solea senegalensis*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, *225*, 59-64.  
doi:10.1016/j.cbpa.2018.06.022
- Chelmonska, B., Jerysz, A., Lukaszewicz, E., Kowalczyk, A., & Malecki, I. (2008). Semen Collection from Japanese Quail (*Coturnix japonica*) Using a Teaser Female. In (Vol. 32 pp. 19-24). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*.
- Cheng, F. P., Guo, T. J., Wu, J. T., Lin, T. E., Ursem, P. J., Colenbrander, B., & Fung, H. P. (2002). Annual variation in semen characteristics of pigeons (*Columba livia*). *Poult Sci*, *81*(7), 1050-1056.
- Chowdhury, V. S., Yamamoto, K., Ubuka, T., Bentley, G. E., Hattori, A., & Tsutsui, K. (2010). Melatonin stimulates the release of gonadotropin-inhibitory hormone by the avian hypothalamus. *Endocrinology*, *151*(1), 271-280.  
doi:10.1210/en.2009-0908
- Christmas, R. B., & Harms, R. H. (1982). Incidence of Double Yoloked Eggs in the Initial Stages of Lay as Affected by Strain and Season of the Year1. *Poultry Science*, *61*(7), 1290-1292. doi:10.3382/ps.0611290
- Christou, F., Pitteloud, N., & Gomez, F. (2017). The induction of ovulation by pulsatile administration of GnRH: an appropriate method in hypothalamic amenorrhea. *Gynecol Endocrinol*, *33*(8), 598-601.  
doi:10.1080/09513590.2017.1296948

- Ciftci, H. B. (2012). Effect of estradiol-17beta on follicle-stimulating hormone secretion and egg-laying performance of Japanese quail. *Animal*, 6(12), 1955-1960. doi:10.1017/s1751731112000997
- Costa, A. R., Rodrigues, M. E., Henriques, M., Oliveira, R., & Azeredo, J. (2014). Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production. *Crit Rev Biotechnol*, 34(4), 281-299. doi:10.3109/07388551.2013.793649
- Croze, F., & Etches, R. J. (1980). The physiological significance of androgen-induced ovulation in the hen. *J Endocrinol*, 84(1), 163-171.
- D'Antonio, M., Borrelli, F., Datola, A., Bucci, R., Mascia, M., Polletta, P., Papoian, R. (1999). Biological characterization of recombinant human follicle stimulating hormone isoforms. *Hum Reprod*, 14(5), 1160-1167.
- da Paz, R. C., Dias, E. A., Adania, C. H., Barnabe, V. H., & Barnabe, R. C. (2006). Ovarian response to repeated administration of alternating exogenous gonadotropin regimens in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrinus (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology*, 66(6-7), 1787-1789. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.01.017
- Dafopoulos, K., Mademtzis, I., Vanakara, P., Kallitsaris, A., Stamatou, G., Kotsovassilis, C., & Messinis, I. E. (2006). Evidence that termination of the estradiol-induced luteinizing hormone surge in women is regulated by ovarian factors. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(2), 641-645. doi:10.1210/jc.2005-1656
- Das, B. C., & Nalbandov, A. V. (1955). Responses of ovaries of immature chickens to avian and mammalian gonadotrophins. *Endocrinology*, 57(6), 705-710. doi:10.1210/endo-57-6-705
- Dawson, A., & Goldsmith, A. R. (1997). Changes in gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-I) in the pre-optic area and median eminence of starlings (*Sturnus vulgaris*) during the recovery of photosensitivity and during photostimulation. *J Reprod Fertil*, 111(1), 1-6.
- Deeley, R. G., Gordon, J. I., Burns, A. T., Mullinix, K. P., Binastein, M., & Goldberg, R. F. (1977). Primary activation of the vitellogenin gene in the rooster. *J Biol Chem*, 252(22), 8310-8319.
- Deeley, R. G., Mullinix, D. P., Wetekam, W., Kronenberg, H. M., Meyers, M., Eldridge, J. D., & Goldberger, R. F. (1975). Vitellogenin synthesis in the

- avian liver. Vitellogenin is the precursor of the egg yolk phosphoproteins. *J Biol Chem*, 250(23), 9060-9066.
- Devroey, P., van Steirteghem, A., Mannaerts, B., & Bennink, H. C. (1992). Successful in-vitro fertilisation and embryo transfer after treatment with recombinant human FSH. In *Lancet* (Vol. 339, pp. 1170). England.
- Diaz, F. J., Anthony, K., & Halfhill, A. N. (2011). Early avian follicular development is characterized by changes in transcripts involved in steroidogenesis, paracrine signaling and transcription. *Mol Reprod Dev*, 78(3), 212-223. doi:10.1002/mrd.21288
- Dingermann, T. (2008). Recombinant therapeutic proteins: production platforms and challenges. *Biotechnol J*, 3(1), 90-97. doi:10.1002/biot.200700214
- Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N., & Matzuk, M. M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383(6600), 531-535. doi:10.1038/383531a0
- Dong, X. Y., Jiang, Y. J., Wang, M. Q., Wang, Y. M., & Zou, X. T. (2013). Effects of in ovo feeding of carbohydrates on hatchability, body weight, and energy status in domestic pigeons (*Columba livia*). *Poult Sci*, 92(8), 2118-2123. doi:10.3382/ps.2013-03091
- Dougherty, D. C., & Sanders, M. M. (2005). Estrogen action: revitalization of the chick oviduct model. *Trends Endocrinol Metab*, 16(9), 414-419. doi:10.1016/j.tem.2005.09.001
- Durlinger, A. L., Gruijters, M. J., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H. A., Nachtigal, M. W., Themmen, A. P. (2002). Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, 143(3), 1076-1084. doi:10.1210/endo.143.3.8691
- Durlinger, A. L., Gruijters, M. J., Kramer, P., Karels, B., Kumar, T. R., Matzuk, M. M., Themmen, A. P. (2001). Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*, 142(11), 4891-4899. doi:10.1210/endo.142.11.8486
- El Halawani, M. E., Silsby, J. L., Fehrer, S. C., & Behnke, E. J. (1983). Effects of estrogen and progesterone on serum prolactin and luteinizing hormone levels in ovariectomized turkeys (*Meleagris gallopavo*). *Gen Comp Endocrinol*, 52(1), 67-78.

- Etches, R. J., & Cunningham, F. J. (1976). The interrelationship between progesterone and luteinizing hormone during the ovulation cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *J Endocrinol*, 71(1), 51-58.
- Ewing, S. R., Nager, R. G., Nicoll, M. A., Aumjaud, A., Jones, C. G., & Keller, L. F. (2008). Inbreeding and loss of genetic variation in a reintroduced population of Mauritius Kestrel. *Conserv Biol*, 22(2), 395-404. doi:10.1111/j.1523-1739.2008.00884.x
- Fath, S., Bauer, A. P., Liss, M., Spriestersbach, A., Maertens, B., Hahn, P., Wagner, R. (2011). Multiparameter RNA and codon optimization: a standardized tool to assess and enhance autologous mammalian gene expression. *PLoS One*, 6(3), e17596. doi:10.1371/journal.pone.0017596
- Fiete, D., Srivastava, V., Hindsgaul, O., & Baenziger, J. U. (1991). A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO<sub>4</sub>-4GalNAc beta 1,4GlcNAc beta 1,2Man alpha that mediates rapid clearance of lutropin. *Cell*, 67(6), 1103-1110.
- Flack, M. R., Froehlich, J., Bennet, A. P., Anasti, J., & Nisula, B. C. (1994). Site-directed mutagenesis defines the individual roles of the glycosylation sites on follicle-stimulating hormone. *J Biol Chem*, 269(19), 14015-14020.
- Fontaine, E., & Fontbonne, A. (2011). Clinical use of GnRH agonists in canine and feline species. *Reprod Domest Anim*, 46(2), 344-353. doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01705.x
- Foster, D. N., & Foster, L. K. (1991). Cloning and sequence analysis of the common alpha-subunit complementary deoxyribonucleic acid of turkey pituitary glycoprotein hormones. *Poult Sci*, 70(12), 2516-2523.
- Foster, D. N., Galehouse, D., Giordano, T., Min, B., Lamb, I. C., Porter, D. A., . . . Bacon, W. L. (1992). Nucleotide sequence of the cDNA encoding the common alpha subunit of the chicken pituitary glycoprotein hormones. *J Mol Endocrinol*, 8(1), 21-27.
- Fraps, R. M., & Riley, G. M. (1942). Hormone-Induced Ovulation in Domestic Fowl. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 49(2), 253-257. doi:10.3181/00379727-49-13532
- Fridolfsson, A.-K., & Ellegren, H. (1999). A Simple and Universal Method for Molecular Sexing of Non-Ratite Birds. *Journal of Avian Biology*, 30(1), 116-121. doi:10.2307/3677252

- Galway, A. B., Hsueh, A. J., Keene, J. L., Yamoto, M., Fauser, B. C., & Boime, I. (1990). In vitro and in vivo bioactivity of recombinant human follicle-stimulating hormone and partially deglycosylated variants secreted by transfected eukaryotic cell lines. *Endocrinology*, 127(1), 93-100. doi:10.1210/endo-127-1-93
- Garcia-Campayo, V., Sugahara, T., & Boime, I. (2002). Unmasking a new recognition signal for O-linked glycosylation in the chorionic gonadotropin beta subunit. *Mol Cell Endocrinol*, 194(1-2), 63-70.
- Gilbert, A. B., Davidson, M. F., Hardie, M. A., & Wells, J. W. (1981). The induction of atresia in the domestic fowl (*Gallus domesticus*) by ovine LH. *Gen Comp Endocrinol*, 44(3), 344-349.
- Gilbert, A. B., Perry, M. M., Waddington, D., & Hardie, M. A. (1983). Role of atresia in establishing the follicular hierarchy in the ovary of the domestic hen (*Gallus domesticus*). *J Reprod Fertil*, 69(1), 221-227.
- Ginther, O. J. (2012). The mare: a 1000-pound guinea pig for study of the ovulatory follicular wave in women. *Theriogenology*, 77(5), 818-828. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.09.025
- Girling, J. E., Bennett, E. J., & Cockrem, J. F. (2002). Administration of pregnant mare serum gonadotropin to Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*): dose response over seven days and comparison of delivery by daily injection or osmotic pump. *N Z Vet J*, 50(3), 115-121. doi:10.1080/00480169.2002.36293
- Gloaguen, P., Crepieux, P., Heitzler, D., Poupon, A., & Reiter, E. (2011). Mapping the follicle-stimulating hormone-induced signaling networks. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2, 45. doi:10.3389/fendo.2011.00045
- Goerlich, V. C., Dijkstra, C., & Groothuis, T. G. (2010). No evidence for selective follicle abortion underlying primary sex ratio adjustment in pigeons. *Behav Ecol Sociobiol*, 64(4), 599-606. doi:10.1007/s00265-009-0877-4
- Goerlich-Jansson, V. C., Muller, M. S., & Groothuis, T. G. (2013). Manipulation of primary sex ratio in birds: lessons from the homing pigeon (*Columba livia domestica*). *Integr Comp Biol*, 53(6), 902-912. doi:10.1093/icb/ict056
- Green, E. D., & Baenziger, J. U. (1988). Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. I. Structural elucidation of the sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem*, 263(1), 25-35.

- Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K., & Dawson, R. J. (1998). A DNA test to sex most birds. *Mol Ecol*, 7(8), 1071-1075.
- Guioli, S., Nandi, S., Zhao, D., Burgess-Shannon, J., Lovell-Badge, R., & Clinton, M. (2014). Gonadal asymmetry and sex determination in birds. *Sex Dev*, 8(5), 227-242. doi:10.1159/000358406
- Guyomarc'h, C., Lumineau, S., Vivien-Roels, B., Richard, J., & Deregnacourt, S. (2001). Effect of melatonin supplementation on the sexual development in European quail (*Coturnix coturnix*). *Behav Processes*, 53(1-2), 121-130.
- Hammond, R. W., Burke, W. H., & Hertelendy, F. (1981). Influence of follicular maturation on progesterone release in chicken granulosa cells in response to turkey and ovine gonadotropins. *Biol Reprod*, 24(5), 1048-1055.
- Hartree, A. S., & Cunningham, F. J. (1969). Purification of chicken pituitary follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *J Endocrinol*, 43(4), 609-616.
- Hassing, J. M., Kletter, G. B., I'Anson, H., Wood, R. I., Beitins, I. Z., Foster, D. L., & Padmanabhan, V. (1993). Pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone does not alter the follicle-stimulating hormone (FSH) isoform distribution pattern of pituitary or circulating FSH in nutritionally growth-restricted ovariectomized lambs. *Endocrinology*, 132(4), 1527-1536. doi:10.1210/endo.132.4.8462450
- Hattori, A., Ishii, S., & Wada, M. (1986). Effects of two kinds of chicken luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH), mammalian LH-RH and its analogs on the release of LH and FSH in Japanese quail and chicken. *Gen Comp Endocrinol*, 64(3), 446-455.
- Hattori, A., Ishii, S., Wada, M., Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Igarashi, M., & Sakakibara, S. (1985). Effects of chicken (Gln8)- and mammalian (Arg8)-luteinizing hormone-releasing hormones on the release of gonadotrophins in vitro and in vivo from the adenohypophysis of Japanese quail. *Gen Comp Endocrinol*, 59(1), 155-161.
- Havelock, J. C., Rainey, W. E., & Carr, B. R. (2004). Ovarian granulosa cell lines. *Mol Cell Endocrinol*, 228(1-2), 67-78. doi:10.1016/j.mce.2004.04.018
- Haywood, S. (1993). Sensory and Hormonal Control of Clutch Size in Birds. *The Quarterly Review of Biology*, 68(1), 33-60.

- Henare, S. J., Kikuchi, M., Talbot, R. T., & Cockrem, J. F. (2012). Changes in plasma gonadotrophins, 17beta-oestradiol, progesterone, prolactin, thyroxine and triiodothyronine concentrations in female Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) of a heavy body weight line during photo-induced ovarian growth and regression. *Br Poult Sci*, 53(4), 520-530. doi:10.1080/00071668.2012.719147
- Hillier, S. G., Whitelaw, P. F., & Smyth, C. D. (1994). Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol*, 100(1-2), 51-54.
- Holt, W. V., Brown, J. L., & Comizzoli, P. (2014). Reproductive science as an essential component of conservation biology. *Adv Exp Med Biol*, 753, 3-14. doi:10.1007/978-1-4939-0820-2\_1
- Hoppen, H. O. (1994). The equine placenta and equine chorionic gonadotrophin--an overview. *Exp Clin Endocrinol*, 102(3), 235-243. doi:10.1055/s-0029-1211287
- Howard, J. G., Roth, T. L., Byers, A. P., Swanson, W. F., & Wildt, D. E. (1997). Sensitivity to exogenous gonadotropins for ovulation induction and laparoscopic artificial insemination in the cheetah and clouded leopard. *Biol Reprod*, 56(4), 1059-1068.
- Hrabia, A., Ha, Y., & Shimada, K. (2004). Expression of estrogen receptor alpha mRNA in theca and granulosa layers of the ovary in relation to follicular growth in quail. *Folia Biol (Krakow)*, 52(3-4), 191-195.
- Hrabia, A., Lesniak-Walentyn, A., Sechman, A., & Gertler, A. (2014). Chicken oviduct-the target tissue for growth hormone action: effect on cell proliferation and apoptosis and on the gene expression of some oviduct-specific proteins. *Cell Tissue Res*, 357(1), 363-372. doi:10.1007/s00441-014-1860-6
- Hrabia, A., Sechman, A., & Rzasa, J. (2014). Effect of growth hormone on basal and LH-stimulated steroid secretion by chicken yellow ovarian follicles. An in vitro study. *Folia Biol (Krakow)*, 62(4), 313-319.
- Hsieh, Y. L., Chatterjee, A., Chien, J. T., & Yu, J. Y. (2001). Molecular cloning of the cDNAs for pituitary glycoprotein hormone alpha subunits of two species of duck and their gene regulation. *J Mol Endocrinol*, 27(3), 339-347.
- Hu, S. Q., & Zadworny, D. (2017). Effects of nonglycosylated and glycosylated prolactin on basal and gonadotropin-stimulated steroidogenesis in chicken

- ovarian follicles. *Domest Anim Endocrinol*, 61, 27-38. doi:10.1016/j.domaniend.2017.05.002
- Huang, E. S., Kao, K. J., & Nalbandov, A. V. (1979). Synthesis of sex steroids by cellular components of chicken follicles. *Biol Reprod*, 20(3), 454-461.
- Huang, E. S., & Nalbandov, A. V. (1979). Steroidogenesis of chicken granulosa and theca cells: in vitro incubation system. *Biol Reprod*, 20(3), 442-453.
- Ikegami, K., & Yoshimura, T. (2012). Circadian clocks and the measurement of daylength in seasonal reproduction. *Mol Cell Endocrinol*, 349(1), 76-81. doi:10.1016/j.mce.2011.06.040
- Imai, K. (1972). Effects of avian and mammalian pituitary preparationson on follicular growth in hens treated with methallibure or fasting. *J Reprod Fertil*, (31), 387-397
- Imai, K. (1973). Effects of avian and mammalian pituitary preparations on induction of ovulation in the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *J Reprod Fertil*, 33(1), 91-98.
- Ipek, A., Sahan, U., Baycan, S. C., & Sozcu, A. (2014). The effects of different eggshell temperatures on embryonic development, hatchability, chick quality, and first-week broiler performance. *Poult Sci*, 93(2), 464-472. doi:10.3382/ps.2013-03336
- Jacob, M., & Bakst, M. R. (2007a). Developmental Anatomy of the Female Reproductive Tract. In B. G. M. Jamieson (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Birds* (Vol. 6A, pp. 149-179). Enfield, NH, USA: Science Publishers.
- Jacob, M., & Bakst, M. R. (2007b). Developmental Anatomy of the Female Reproductive Tract. In B. G. Jamieson (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Birds* (Vol. 6, pp. 149-179). Enfield, NH, USA: Science Publishers.
- Jennings, M. W., Boime, I., Daphna-Iken, D., Jablonka-Shariff, A., Conley, A. J., Colgin, M., Roser, J. F. (2009). The efficacy of recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) to promote follicular growth in mares using a follicular suppression model. *Anim Reprod Sci*, 116(3-4), 291-307. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.01.013

- John, G. B., Shidler, M. J., Besmer, P., & Castrillon, D. H. (2009). Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation. *Dev Biol*, 331(2), 292-299. doi:10.1016/j.ydbio.2009.05.546
- Johnson, A. L. (1986). Effects of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) on pituitary responsiveness to progesterone and LHRH in the hen, *Gallus domesticus*. *Domestic Animal Endocrinology*, 3(1), 33-38. doi:[https://doi.org/10.1016/0739-7240\(86\)90038-X](https://doi.org/10.1016/0739-7240(86)90038-X)
- Johnson, A. L. (2014). The avian ovary and follicle development: Some comparative and practical insights. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* (38), 660-669).
- Johnson, A. L. (2015). Ovarian follicle selection and granulosa cell differentiation. *Poult Sci*, 94(4), 781-785. doi:10.3382/ps/peu008
- Johnson, A. L., & Bridgham, J. T. (2001). Regulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid in hen granulosa cells. *Endocrinology*, 142(7), 3116-3124. doi:10.1210/endo.142.7.8240
- Johnson, A. L., Bridgham, J. T., & Wagner, B. (1996). Characterization of a chicken luteinizing hormone receptor (cLH-R) complementary deoxyribonucleic acid, and expression of cLH-R messenger ribonucleic acid in the ovary. *Biol Reprod*, 55(2), 304-309.
- Johnson, A. L., & Lee, J. (2016). Granulosa cell responsiveness to follicle stimulating hormone during early growth of hen ovarian follicles. *Poult Sci*, 95(1), 108-114. doi:10.3382/ps/pev318
- Johnson, A. L., & Leone, E. W. (1985). Ovine luteinizing hormone-induced steroid and luteinizing hormone secretion, and ovulation in intact and pregnant mare serum gonadotropin-primed hens. *Poult Sci*, 64(11), 2171-2179. doi:10.3382/ps.0642171
- Johnson, A. L., & Woods, D. C. (2007). Ovarian Dynamics and Follicle Development. In B. G. M. Jamieson (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Birds* (Vol. 6A, pp. 243-277). Enfield, NH, USA: Science Publishers.
- Johnson, A. L., & Woods, D. C. (2009). Dynamics of avian ovarian follicle development: cellular mechanisms of granulosa cell differentiation. *Gen Comp Endocrinol*, 163(1-2), 12-17. doi:10.1016/j.ygcen.2008.11.012

- Johnson, P. A. (2012). Follicle selection in the avian ovary. *Reprod Domest Anim*, 47 Suppl 4, 283-287. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02087.x
- Johnson, P. A., Dickens, M. J., Kent, T. R., & Giles, J. R. (2005). Expression and function of growth differentiation factor-9 in an oviparous species, *Gallus domesticus*. *Biol Reprod*, 72(5), 1095-1100. doi:10.1095/biolreprod.104.036822
- Johnson, P. A., Green, C., Lee, H. T., & Bahr, J. M. (1988). Inhibition of progesterone secretion from granulosa cells by estradiol and androgens in the domestic hen. *Endocrinology*, 123(1), 473-477. doi:10.1210/endo-123-1-473
- Johnson, P. A., Johnson, A. L., & van Tienhoven, A. (1985). Evidence for a positive feedback interaction between progesterone and luteinizing hormone in the induction of ovulation in the hen, *Gallus domesticus*. *Gen Comp Endocrinol*, 58(3), 478-485.
- Johnson, P. A., Stephens, C. S., & Giles, J. R. (2015). The domestic chicken: Causes and consequences of an egg a day. *Poult Sci*, 94(4), 816-820. doi:10.3382/ps/peu083
- Johnson, P. A., Stoklosowa, S., & Bahr, J. M. (1987). Interaction of granulosa and theca layers in the control of progesterone secretion in the domestic hen. *Biol Reprod*, 37(5), 1149-1155.
- Karami, K., Zerehdaran, S., Barzаноoni, B., & Lotfi, E. (2017). Genetic analyses of partial egg production in Japanese quail using multi-trait random regression models. *Br Poult Sci*, 58(6), 624-628. doi:10.1080/00071668.2017.1378423
- Kawashima, M., Takahashi, T., Kamiyoshi, M., & Tanaka, K. (1996). Effects of progesterone, estrogen, and androgen on progesterone receptor binding in hen oviduct uterus (shell gland). *Poult Sci*, 75(2), 257-260. doi:10.3382/ps.0750257
- Kennedy, E. D. (1991). Determinate and Indeterminate Egg-Laying Patterns: A Review. *The Condor*, 93(1), 106-124. doi:10.2307/1368612
- Kesner, J. S., Convey, E. M., & Anderson, C. R. (1981). Evidence that estradiol induces the preovulatory LH surge in cattle by increasing pituitary sensitivity to LHRH and then increasing LHRH release. *Endocrinology*, 108(4), 1386-1391. doi:10.1210/endo-108-4-1386

- Kesner, J. S., Kraeling, R. R., Rampacek, G. B., & Johnson, B. (1987). Absence of an estradiol-induced surge of luteinizing hormone in pigs receiving unvarying pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulation. *Endocrinology*, 121(5), 1862-1869. doi:10.1210/endo-121-5-1862
- Kikuchi, M., Kobayashi, M., Ito, T., Kato, Y., & Ishii, S. (1998). Cloning of complementary deoxyribonucleic acid for the follicle-stimulating hormone-beta subunit in the Japanese quail. *Gen Comp Endocrinol*, 111(3), 376-385. doi:10.1006/gcen.1998.7123
- Kim, D., & Johnson, A. L. (2018). Differentiation of the granulosa layer from hen prehierarchal follicles associated with follicle-stimulating hormone receptor signaling. *Mol Reprod Dev*. 85(8-9) 729-737. doi:10.1002/mrd.23042
- Kim, D., Ocon-Grove, O., & Johnson, A. L. (2013). Bone morphogenetic protein 4 supports the initial differentiation of hen (*Gallus gallus*) granulosa cells. *Biol Reprod*, 88(6), 161. doi:10.1095/biolreprod.113.109694
- King, J. A., Davidson, J. S., Mehl, A. E., Wakefield, I. K., Andersson, P. B., & Millar, R. P. (1989). Gonadal steroid modulation of signal transduction and luteinizing hormone release in cultured chicken pituitary cells. *Endocrinology*, 124(4), 1830-1840. doi:10.1210/endo-124-4-1830
- King, J. A., & Millar, R. P. (1982a). Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. I. Structural determination on partially purified material. *J Biol Chem*, 257(18), 10722-10728.
- King, J. A., & Millar, R. P. (1982b). Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. II. Isolation and characterization. *J Biol Chem*, 257(18), 10729-10732.
- Kinsky, F. C. (1971). The consistent presence of paired ovaries in the Kiwi (*Apteryx*) with some discussion of this condition in other birds. *Journal für Ornithologie*, 112(3), 334-357. doi:10.1007/BF01640692
- Klein, J., Lobel, L., Pollak, S., Ferin, M., Xiao, E., Sauer, M., & Lustbader, J. W. (2002). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single-chain recombinant human follicle-stimulating hormone containing the human chorionic gonadotropin carboxyterminal peptide in the rhesus monkey. *Fertil Steril*, 77(6), 1248-1255.

- Klein, J., Lobel, L., Pollak, S., Lustbader, B., Ogden, R. T., Sauer, M. V., & Lustbader, J. W. (2003). Development and characterization of a long-acting recombinant hFSH agonist. *Hum Reprod*, 18(1), 50-56.
- Knight, P. G., & Glister, C. (2003). Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci*, 78(3-4), 165-183.
- Ko, H., Park, W., Kim, D. J., Kobayashi, M., & Sohn, Y. C. (2007). Biological activities of recombinant Manchurian trout FSH and LH: their receptor specificity, steroidogenic and vitellogenic potencies. *J Mol Endocrinol*, 38(1-2), 99-111. doi:10.1677/jme.1.02163
- Koike, T. I., Shimada, K., & Cornett, L. E. (1988). Plasma levels of immunoreactive mesotocin and vasotocin during oviposition in chickens: relationship to oxytocic action of the peptides in vitro and peptide interaction with myometrial membrane binding sites. *Gen Comp Endocrinol*, 70(1), 119-126.
- Kopf, G. S., Visconti, P. E., & Galantino-Homer, H. (1999). Capacitation of the Mammalian Spermatozoon. In P. M. Wassarman (Ed.), *Advances in Developmental Biochemistry* (Vol. 5, pp. 83-107): Academic Press.
- Kowalski, K. I., Tilly, J. L., & Johnson, A. L. (1991). Cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc) in the hen ovary. I. Regulation of P450scc messenger RNA levels and steroidogenesis in theca cells of developing follicles. *Biol Reprod*, 45(6), 955-966.
- Kriegsfeld, L. J., Ubuka, T., Bentley, G. E., & Tsutsui, K. (2015). Seasonal control of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) in birds and mammals. *Front Neuroendocrinol*, 37, 65-75. doi:10.1016/j.yfrne.2014.12.001
- Krishnan, K. A., Proudman, J. A., & Bahr, J. M. (1992). Purification and characterization of chicken follicle-stimulating hormone. *Comp Biochem Physiol B*, 102(1), 67-75.
- Krishnan, K. A., Proudman, J. A., & Bahr, J. M. (1994). Purification and partial characterization of isoforms of luteinizing hormone from the chicken pituitary gland. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol*, 108(2), 253-264.
- Kundu, M. C., Wojtusik, J., & Johnson, P. A. (2012). Expression and regulation of Kit ligand in the ovary of the hen. *Gen Comp Endocrinol*, 179(1), 47-52. doi:10.1016/j.ygcen.2012.07.025

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680. doi:10.1038/227680a0
- Lam, J. S., Huang, H., & Levitz, S. M. (2007). Effect of differential N-linked and O-linked mannosylation on recognition of fungal antigens by dendritic cells. *PLoS One*, 2(10), e1009. doi:10.1371/journal.pone.0001009
- Lang, G. F., Etches, R. J., & Walton, J. S. (1984). Effects of luteinizing hormone, progesterone, testosterone, estradiol and corticosterone on ovulation and luteinizing hormone release in hens treated with aminoglutethimide. *Biol Reprod*, 30(2), 278-288.
- Lee, H. T., & Bahr, J. M. (1990). Inhibition of the activities of P450 cholesterol side-chain cleavage and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the amount of P450 cholesterol side-chain cleavage by testosterone and estradiol-17 beta in hen granulosa cells. *Endocrinology*, 126(2), 779-786. doi:10.1210/endo-126-2-779
- Levorse, J. M., & Johnson, A. L. (1994). Regulation of steroid production in ovarian stromal tissue from 5- to 8-week-old pullets and laying hens. *J Reprod Fertil*, 100(1), 195-202.
- Li, J., Leghari, I. H., He, B., Zeng, W., Mi, Y., & Zhang, C. (2014). Estrogen stimulates expression of chicken hepatic vitellogenin II and very low-density apolipoprotein II through ER-alpha. *Theriogenology*, 82(3), 517-524. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.05.003
- Li, Q., Tamarkin, L., Levantine, P., & Ottinger, M. A. (1994). Estradiol and androgen modulate chicken luteinizing hormone-releasing hormone-I release in vitro. *Biol Reprod*, 51(5), 896-903.
- Lien, R. J., Cain, J. R., & Forrest, D. W. (1985). The influence of exogenous estradiol on bobwhite quail (*Colinus virginianus*) reproductive systems. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 80(3), 433-436.
- Lierz, M., Reinschmidt, M., Muller, H., Wink, M., & Neumann, D. (2013). A novel method for semen collection and artificial insemination in large parrots (Psittaciformes). *Sci Rep*, 3, 2066. doi:10.1038/srep02066
- Lilienthal, S., Drotleff, A. M., & Ternes, W. (2015). Changes in the protein secondary structure of hen's egg yolk determined by Fourier transform infrared spectroscopy during the first eight days of incubation. *Poult Sci*, 94(1), 68-79. doi:10.3382/ps/peu051

- Lincoln, G. A., Racey, P. A., Sharp, P. J., Klandorf, H. (1980). Endocrine changes associated with spring and autumn sexuality of the Rook, *Corvus frugilegus*. In (Vol. 190, pp. 137-153). Journal of Zoology.
- Liu, H. K., Lilburn, M. S., Koyyeri, B., Anderson, J. W., & Bacon, W. L. (2004). Preovulatory surge patterns of luteinizing hormone, progesterone, and estradiol-17beta in broiler breeder hens fed ad libitum or restricted fed. *Poult Sci*, 83(5), 823-829. doi:10.1093/ps/83.5.823
- Liu, H. K., Nestor, K. E., Long, D. W., & Bacon, W. L. (2001). Frequency of luteinizing hormone surges and egg production rate in turkey hens. *Biol Reprod*, 64(6), 1769-1775.
- Lovell, T. M., Knight, P. G., Groome, N. P., & Gladwell, R. T. (2001). Changes in plasma inhibin A levels during sexual maturation in the female chicken and the effects of active immunization against inhibin alpha-subunit on reproductive hormone profiles and ovarian function. *Biol Reprod*, 64(1), 188-196.
- Lovell, T. M., Vanmontfort, D., Bruggeman, V., Decuypere, E., Groome, N. P., Knight, P. G., & Gladwell, R. T. (2000). Circulating concentrations of inhibin-related proteins during the ovulatory cycle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*) and after induced cessation of egg laying. *J Reprod Fertil*, 119(2), 323-328.
- Lukasiewicz M., Wnek K., Boruk, K. (2014). Biology of embryo development in Pigeon *Columba livia domesticus* in conditions of artificial incubation. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 2 (7) 401-406.
- Luong, M., Lam, J. S., Chen, J., & Levitz, S. M. (2007). Effects of fungal N- and O-linked mannosylation on the immunogenicity of model vaccines. *Vaccine*, 25(22), 4340-4344. doi:10.1016/j.vaccine.2007.03.027
- Lynn, S. E., & Porter, A. J. (2008). Trapping initiates stress response in breeding and no-breeding house sparrows *Passer domesticus* : Implications for using unmonitored traps in field studies. In (Vol. 39, pp. 87-94): Journal of Avian Biology.
- Maddineni, S., Ocon-Grove, O. M., Krzysik-Walker, S. M., Hendricks, G. L., 3rd, Proudman, J. A., & Ramachandran, R. (2008). Gonadotrophin-inhibitory hormone receptor expression in the chicken pituitary gland: potential

- influence of sexual maturation and ovarian steroids. *J Neuroendocrinol*, 20(9), 1078-1088. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01765.x
- Maney, D. L., Richardson, R. D., & Wingfield, J. C. (1997). Central administration of chicken gonadotropin-releasing hormone-II enhances courtship behavior in a female sparrow. *Horm Behav*, 32(1), 11-18. doi:10.1006/hbeh.1997.1399
- Manning, R., Courtney, S., & Talbot, S. (1989). Temporal changes in plasma and liver lipids and in the hepatic activities of acetyl-coenzyme a carboxylase and fatty acid synthetase after oestrogen treatment of the male chicken (gallus domesticus). *International Journal of Biochemistry*, 21(5), 517-523. doi:[https://doi.org/10.1016/0020-711X\(89\)90131-6](https://doi.org/10.1016/0020-711X(89)90131-6)
- Marchal, I., Jarvis, D. L., Cacan, R., & Verbert, A. (2001). Glycoproteins from insect cells: sialylated or not? *Biol Chem*, 382(2), 151-159. doi:10.1515/bc.2001.023
- Marks, H. L., & Lepore, P. D. (1965). A Procedure for Artificial Insemination of Japanese Quail. *Poultry Science*, 44(4), 1001-1003. doi:10.3382/ps.0441001
- Matthews, H. L. (1939). Visual stimulation and ovulation in pigeon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B -Biological Sciences*, 126 (845), 557-560.
- Mazón, M.J., Gómez, A., Yilmaz, O., Carrillo, M., Zanuy, S. (2014). Administration of Follicle-Stimulating Hormone In Vivo Triggers Testicular Recrudescence of Juvenile Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol Reprod* 90(1):6, 1-10.
- McFarlane, H. O., Joseph, N. T., Maddineni, S. R., Ramachandran, R., & Bedecarrats, G. Y. (2011). Development, validation, and utilization of a novel antibody specific to the type III chicken gonadotropin-releasing hormone receptor. *Domest Anim Endocrinol*, 40(2), 110-118. doi:10.1016/j.domaniend.2010.09.005
- Melnychuk, V. L., Cooper, M. W., Kirby, J. D., Rorie, R. W., & Anthony, N. B. (2002). Use of ultrasonography to characterize ovarian status in chicken. *Poult Sci*, 81(6), 892-895. doi:10.1093/ps/81.6.892
- Meyers-Brown, G., Bidstrup, L. A., Famula, T. R., Colgin, M., & Roser, J. F. (2011). Treatment with recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) followed by recombinant equine luteinizing hormone (reLH) increases embryo recovery in superovulated mares. *Anim Reprod Sci*, 128(1-4), 52-59. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.09.002

- Mihm, M., & Evans, A. C. (2008). Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. *Reprod Domest Anim*, 43 Suppl 2, 48-56. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01142.x
- Mitchell, M. E. (1967a). Stimulation of the ovary in hypophysectomized hens by an avian pituitary preparation. *J Reprod Fertil*, 14(2), 249-256.
- Mitchell, M. E. (1967b). The effects of avian gonadotrophin precipitate on pituitary-deficient hens. *J Reprod Fertil*, 14(2), 257-263.
- Mitchell, M. E. (1970). Treatment of hypophysectomized hens with partially purified avian FSH. *J Reprod Fertil*, 22(2), 233-241.
- Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Nomura, M., Igarashi, M., Kangawa, K., & Matsuo, H. (1984). Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(12), 3874-3878.
- Mizushima, S., Hiyama, G., Shiba, K., Inaba, K., Dohra, H., Ono, T., Sasanami, T. (2014). The birth of quail chicks after intracytoplasmic sperm injection. *Development*, 141(19), 3799-3806. doi:10.1242/dev.111765
- Mizutani, T., Minegishi, T., Nonobe, Y., Abe, Y., Hasegawa, Y., Wakabayashi, K., . . . Miyamoto, K. (1998). Molecular cloning and functional expression of chicken luteinizing hormone receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1397(1), 1-8.
- Moynihan, J. B., & Edwards, N. A. (1975). Electrolyte secretion by the magnum of the domestic fowl during egg-shell calcification. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 50(4), 743-745.
- Nakanishi A., Utsumi, K., & Iritani, A. (1990). Early nuclear events of in vitro fertilization in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Mol Reprod Dev*, 26(3), 217-221. doi:10.1002/mrd.1080260304
- Navara, K. J., Pinson, S. E., Chary, P., & Taube, P. C. (2015). Higher rates of internal ovulations occur in broiler breeder hens treated with testosterone. *Poult Sci*, 94(6), 1346-1352. doi:10.3382/ps/pev103
- Nepomuceno, A. I., Muddiman, D. C., & Petite, J. N. (2015). Global Proteomic Analysis of Functional Compartments in Immature Avian Follicles Using

- Laser Microdissection Coupled to LC-MS/MS. *J Proteome Res*, 14(9), 3912-3923. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00346
- Nestor, C. C., Bedenbaugh, M. N., Hileman, S. M., Coolen, L. M., Lehman, M. N., & Goodman, R. L. (2018). Regulation of GnRH pulsatility in ewes. *Reproduction*, 156(3), R83-r99. doi:10.1530/rep-18-0127
- Nitta, H., Osawa, Y., & Bahr, J. M. (1991a). Immunolocalization of steroidogenic cells in small follicles of the chicken ovary: anatomical arrangement and location of steroidogenic cells change during follicular development. *Domest Anim Endocrinol*, 8(4), 587-594.
- Nitta, H., Osawa, Y., & Bahr, J. M. (1991b). Multiple steroidogenic cell populations in the thecal layer of preovulatory follicles of the chicken ovary. *Endocrinology*, 129(4), 2033-2040. doi:10.1210/endo-129-4-2033
- Nys, Y., Gautron, J., Garcia-Ruiz, J. M., & Hincke, M. T. (2004). Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. *Comptes Rendus Palevol*, 3(6), 549-562. doi:<https://doi.org/10.1016/j.crpv.2004.08.002>
- Ocon-Grove, O. M., Poole, D. H., & Johnson, A. L. (2012). Bone morphogenetic protein 6 promotes FSH receptor and anti-Mullerian hormone mRNA expression in granulosa cells from hen prehierarchical follicles. *Reproduction*, 143(6), 825-833. doi:10.1530/rep-11-0271
- Oka, T., & Schimke, R. T. (1969). Interaction of estrogen and progesterone in chick oviduct development. II. Effects of estrogen and progesterone on tubular gland cell function. *J Cell Biol*, 43(1), 123-137.
- Olson, C. R., Vleck, C. M., & Vleck, D. (2006). Periodic cooling of bird eggs reduces embryonic growth efficiency. *Physiol Biochem Zool*, 79(5), 927-936. doi:10.1086/506003
- Olszanska, B., Stepinska, U., & Perry, M. M. (2002). Development of embryos from in vitro ovulated and fertilized oocytes of the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J Exp Zool*, 292(6), 580-586. doi:10.1002/jez.10096
- Onagbesan, O. M., & Peddie, M. J. (1988). Induction of ovulation and oviposition in female quail with luteinizing hormone, luteinizing hormone releasing hormone, or progesterone. *Gen Comp Endocrinol*, 71(1), 124-131.

- Opel, H., & Nalbandov, A. V. (1961a). Follicular growth and ovulation in hypophysectomized hens. *Endocrinology*, 69, 1016-1028. doi:10.1210/endo-69-6-1016
- Opel, H., & Nalbandov, A. V. (1961b). Onset of follicular atresia following hypophysectomy of the laying hen. *Proc Soc Exp Biol Med*, 107, 233-235.
- Opel, H., & V. Nalbandov, A. (1961). Ovulability of ovarian follicles in the hypophysectomized hen. *Endocrinology*, 69 (6), 1029-1035.
- Otsuka, F., McTavish, K. J., & Shimasaki, S. (2011). Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Mol Reprod Dev*, 78(1), 9-21. doi:10.1002/mrd.21265
- Ottinger, M. A., & Bakst, M. R. (1995). Endocrinology of the Avian Reproductive System. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 9(4), 242-250.
- Palmer, S. S., & Bahr, J. M. (1992). Follicle stimulating hormone increases serum oestradiol-17 beta concentrations, number of growing follicles and yolk deposition in aging hens (*Gallus gallus domesticus*) with decreased egg production. *Br Poult Sci*, 33(2), 403-414. doi:10.1080/00071669208417478
- Palmiter, R. D., & Wrenn, J. T. (1971). Interaction of estrogen and progesterone in chick oviduct development. 3. Tubular gland cell cytodifferentiation. *J Cell Biol*, 50(3), 598-615.
- Parrott, J. A., & Skinner, M. K. (1997). Direct actions of kit-ligand on theca cell growth and differentiation during follicle development. *Endocrinology*, 138(9), 3819-3827. doi:10.1210/endo.138.9.5368
- Parrott, J. A., & Skinner, M. K. (1999). Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, 140(9), 4262-4271. doi:10.1210/endo.140.9.6994
- Parshad, R. K., Kaur, R., & Natt, J. K. (2008). Structural heterogeneity of yolk spheres in hierarchical follicles from hen ovary: a histochemical study. *Br Poult Sci*, 49(3), 265-272. doi:10.1080/00071660802094198
- Patil, M. (2014). Gonadotrophins: The future. *J Hum Reprod Sci*, 7(4), 236-248. doi:10.4103/0974-1208.147490
- Penaranda, D. S., Gallego, V., Rozenfeld, C., Herranz-Jusdado, J. G., Perez, L., Gomez, A., Giménez, I., Asturiano, J. F. (2018). Using specific recombinant gonadotropins to induce spermatogenesis and spermiation in the

- European eel (*Anguilla anguilla*). *Theriogenology*, 107, 6-20. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.11.002
- Perry, M. M., & Gilbert, A. B. (1979). Yolk transport in the ovarian follicle of the hen (*Gallus domesticus*): lipoprotein-like particles at the periphery of the oocyte in the rapid growth phase. *J Cell Sci*, 39, 257-272.
- Petitte, J. N., & Etches, R. J. (1989). The effect of corticosterone on the response of the ovary to pregnant mare's serum gonadotrophin in sexually immature pullets. *Gen Comp Endocrinol*, 74(3), 377-384.
- Pope, C. E. (2014). Aspects of in vivo oocyte production, blastocyst development, and embryo transfer in the cat. *Theriogenology*, 81(1), 126-137. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.006
- Porter, T. E., Hargis, B. M., Silsby, J. L., & el Halawani, M. E. (1989). Differential steroid production between theca interna and theca externa cells: a three-cell model for follicular steroidogenesis in avian species. *Endocrinology*, 125(1), 109-116. doi:10.1210/endo-125-1-109
- Pouwer, A. W., Farquhar, C., & Kremer, J. A. (2015). Long-acting FSH versus daily FSH for women undergoing assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*(7), Cd009577. doi:10.1002/14651858.CD009577.pub3
- Proudman, J. A., Vandesande, F., & Berghman, L. R. (1999). Immunohistochemical evidence that follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone reside in separate cells in the chicken pituitary. *Biol Reprod*, 60(6), 1324-1328.
- Puga Molina, L. C., Luque, G. M., Balestrini, P. A., Marin-Briggiler, C. I., Romarowski, A., & Buffone, M. G. (2018). Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. *Front Cell Dev Biol*, 6, 72. doi:10.3389/fcell.2018.00072
- Rahman, M. A., Baoyindeliger, Iwasawa, A., & Yoshizaki, N. (2007). Mechanism of chalaza formation in quail eggs. *Cell Tissue Res*, 330(3), 535-543. doi:10.1007/s00441-007-0508-1
- Ramasamy Manickam, S., Sakthivel, J., Pazhanivel, N., Kundu, A., & Chellambalasundram. (2014). Regulation of ovarian follicular Atresia through apoptotic process in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* 1(6) 326-330.
- Rangel, P. L., Lassala, A., & Gutierrez, C. G. (2005). Testosterone immunization blocks the ovulatory process in laying hens without affecting ovarian

- follicular development. *Anim Reprod Sci*, 86(1-2), 143-151. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.07.002
- Rangel, P. L., Rodriguez, A., Rojas, S., Sharp, P. J., & Gutierrez, C. G. (2009). Testosterone stimulates progesterone production and STAR, P450 cholesterol side-chain cleavage and LH receptor mRNAs expression in hen (*Gallus domesticus*) granulosa cells. *Reproduction*, 138(6), 961-969. doi:10.1530/rep-09-0071
- Ratna, W. N., Bhatt, V. D., Chaudhary, K., Bin Ariff, A., Bavadekar, S. A., & Ratna, H. N. (2016). Estrogen-responsive genes encoding egg yolk proteins vitellogenin and apolipoprotein II in chicken are differentially regulated by selective estrogen receptor modulators. *Theriogenology*, 85(3), 376-383. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.08.015
- Reiter, E., & Lefkowitz, R. J. (2006). GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab*, 17(4), 159-165. doi:10.1016/j.tem.2006.03.008
- Ren, P., Sairam, M. R., & Yarney, T. A. (1995). Bacterial expression of human chorionic gonadotropin alpha subunit: studies on refolding, dimer assembly and interaction with two different beta subunits. *Mol Cell Endocrinol*, 113(1), 39-51.
- Revel, F. G., Saboureau, M., Pévet, P., Mikkelsen, J. D., & Simonneaux, V. r. (2006). Melatonin Regulates Type 2 Deiodinase Gene Expression in the Syrian Hamster. *Endocrinology*, 147(10), 4680-4687. doi:10.1210/en.2006-0606
- Richards, M. P. (1997). Trace mineral metabolism in the avian embryo. *Poult Sci*, 76(1), 152-164. doi:10.1093/ps/76.1.152
- Robinson, F. E., & Etches, R. J. (1986). Ovarian steroidogenesis during follicular maturation in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biol Reprod*, 35(5), 1096-1105.
- Robinson, F. E., Etches, R. J., Anderson-Langmuir, C. E., Burke, W. H., Cheng, K. W., Cunningham, F. J., Talbot, R. T. (1988). Steroidogenic relationships of gonadotrophin hormones in the ovary of the hen (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol*, 69(3), 455-466.
- Rozenboim, I., Aharony, T., & Yahav, S. (2002). The effect of melatonin administration on circulating plasma luteinizing hormone concentration in

- castrated White Leghorn roosters. *Poultry Science*, 81(9), 1354-1359. doi:10.1093/ps/81.9.1354
- Sakai, H., & Ishii, S. (1986). Annual cycles of plasma gonadotropins and sex steroids in Japanese common pheasants, *Phasianus colchicus versicolor*. *Gen Comp Endocrinol*, 63(2), 275-283.
- Sasaki, F., Doshita, A., Matsumoto, Y., Kuwahara, S., Tsukamoto, Y., & Ogawa, K. (2003). Embryonic development of the pituitary gland in the chick. *Cells Tissues Organs*, 173(2), 65-74. doi:10.1159/000068945
- Sasanami, T., Matsuzaki, M., Mizushima, S., & Hiyama, G. (2013). Sperm storage in the female reproductive tract in birds. *J Reprod Dev*, 59(4), 334-338.
- Sasanami, T., Ohtsuki, M., Hanafy, A., & Mori, M. (2004). Accumulation of ZP1 and ZPC in Quail Perivitelline Membrane During Follicular Development. *The Journal of Poultry Science* 41(4), 289-297.
- Schaper, S. V., Dawson, A., Sharp, P. J., Caro, S. P., & Visser, M. E. (2012). Individual variation in avian reproductive physiology does not reliably predict variation in laying date. *Gen Comp Endocrinol*, 179(1), 53-62. doi:10.1016/j.ygcen.2012.07.021
- Schneider, F., Tomek, W., & Grundker, C. (2006). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: a review. *Theriogenology*, 66(4), 691-709. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.03.025
- Schneider, W. J. (2009). Receptor-mediated mechanisms in ovarian follicle and oocyte development. *Gen Comp Endocrinol*, 163(1-2), 18-23. doi:10.1016/j.ygcen.2008.11.032
- Schneider, W. J. (2016). Lipid transport to avian oocytes and to the developing embryo. *J Biomed Res*, 30(3), 174-180. doi:10.7555/jbr.30.20150048
- Schoemaker, N. J. (2018). Gonadotrophin-Releasing Hormone Agonists and Other Contraceptive Medications in Exotic Companion Animals. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 21(2), 443-464. doi:10.1016/j.cvex.2018.01.011
- Schwartz, N. B. (1969). A model for the regulation of ovulation in the rat. *Recent Prog Horm Res*, 25, 1-55.
- Senior, B. E., & Furr, B. J. (1975). A preliminary assessment of the source of oestrogen within the ovary of the domestic fowl *Gallus domesticus*. *J Reprod Fertil*, 43(2), 241-247.

- Sharp, P. J., Scanes, C. G., & Gilbert, A. B. (1978). In vivo effects of an antiserum to partially purified chicken luteinizing hormone (CM2) in laying hens. *Gen Comp Endocrinol*, 34(3), 296-299.
- Sharp, P. J., Talbot, R. T., Main, G. M., Dunn, I. C., Fraser, H. M., & Huskisson, N. S. (1990). Physiological roles of chicken LHRH-I and -II in the control of gonadotrophin release in the domestic chicken. *J Endocrinol*, 124(2), 291-299.
- Shen, S. T., & Yu, J. Y. (2002). Cloning and gene expression of a cDNA for the chicken follicle-stimulating hormone (FSH)-beta-subunit. *Gen Comp Endocrinol*, 125(3), 375-386. doi:10.1006/gcen.2001.7763
- Shimasaki, S., Moore, R. K., Otsuka, F., & Erickson, G. F. (2004). The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev*, 25(1), 72-101. doi:10.1210/er.2003-0007
- Shimizu, M., & Bedecarrats, G. Y. (2006). Identification of a novel pituitary-specific chicken gonadotropin-releasing hormone receptor and its splice variants. *Biol Reprod*, 75(5), 800-808. doi:10.1095/biolreprod.105.050252
- Silva, L., Simoes, L. M. S., Bottino, M. P., Santos, A. P. C., Santos, G., Martinez, I. Y. H., . . . Sales, J. N. S. (2018). Presynchronization by induction of a largest follicle using a progesterone device in GnRH-based-ovulation synchronization protocol in crossbred dairy cows. *Theriogenology*, 119, 233-237. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.04.030
- Silverin, B., Kikuchi, M., & Ishii, S. (1997). Seasonal changes in follicle-stimulating hormone in free-living great tits. *Gen Comp Endocrinol*, 108(3), 366-373. doi:10.1006/gcen.1997.6980
- Smitz, J., Wolfenson, C., Chappel, S., & Ruman, J. (2016). Follicle-Stimulating Hormone: A Review of Form and Function in the Treatment of Infertility. *Reprod Sci*, 23(6), 706-716. doi:10.1177/1933719115607992
- Sonez, M. C., Sonez, C. A., Mugnaini, M. T., Haedo, M., Romera, S. A., Lombardo, D. M., & Delhon, G. A. (2010). Effects of differential pulse frequencies of chicken gonadotrophin-releasing hormone-I (cGnRH-I) on laying hen gonadotrope responses in vitro. *Biotech Histochem*, 85(6), 355-363. doi:10.3109/10520290903368774
- Sontakke, S. D., Umapathy, G., Sivaram, V., Kholkute, S. D., & Shivaji, S. (2004). Semen characteristics, cryopreservation, and successful artificial

- insemination in the Blue rock pigeon (*Columba livia*). *Theriogenology*, 62(1-2), 139-153. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.08.018
- Sreesujatha, R. M., Jeyakumar, S., Kundu, A., & Balasundaram, C. (2016). Use of transcutaneous ultrasonography to characterize ovarian status, size distribution, and hierarchical status of follicles in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Theriogenology*, 86(5), 1231-1239. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.026
- Stamatiades, G. A., & Kaiser, U. B. (2018). Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. *Mol Cell Endocrinol*, 463, 131-141. doi:10.1016/j.mce.2017.10.015
- Stephens, C. S., & Johnson, P. A. (2016). Bone morphogenetic protein 15 may promote follicle selection in the hen. *Gen Comp Endocrinol*, 235, 170-176. doi:10.1016/j.ygcen.2016.06.027
- Stephens, C. S., & Johnson, P. A. (2017). Occludin expression and regulation in small follicles of the layer and broiler breeder hen. *Gen Comp Endocrinol*, 248, 106-113. doi:10.1016/j.ygcen.2017.02.010
- Stepinska, U., & Bakst, M. R. (2007). Fertilization. In B. G. Jamieson (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Birds* (Vol. 6A). Enfield, NH, USA: Science Publishers.
- Stevenson, T. J., Lynch, K. S., Lamba, P., Ball, G. F., & Bernard, D. J. (2009). Cloning of gonadotropin-releasing hormone I complementary DNAs in songbirds facilitates dissection of mechanisms mediating seasonal changes in reproduction. *Endocrinology*, 150(4), 1826-1833. doi:10.1210/en.2008-1435
- Stewart, F., Allen, W. R., & Moor, R. M. (1976). Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay. *J Endocrinol*, 71(3), 471-482.
- Stifani, S., Barber, D. L., Nimpf, J., & Schneider, W. J. (1990). A single chicken oocyte plasma membrane protein mediates uptake of very low density lipoprotein and vitellogenin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(5), 1955-1959.
- Sugahara, T., Grootenhuis, P. D., Sato, A., Kudo, M., Ben-Menahem, D., Pixley, M. R., . . . Boime, I. (1996). Expression of biologically active fusion genes encoding the common alpha subunit and either the CG beta or FSH beta subunits: role of a linker sequence. *Mol Cell Endocrinol*, 125(1-2), 71-77.

- Sugahara, T., Sato, A., Kudo, M., Ben-Menahem, D., Pixley, M. R., Hsueh, A. J., & Boime, I. (1996). Expression of biologically active fusion genes encoding the common alpha subunit and the follicle-stimulating hormone beta subunit. Role of a linker sequence. *J Biol Chem*, 271(18), 10445-10448.
- Sun, Y. M., Dunn, I. C., Baines, E., Talbot, R. T., Illing, N., Millar, R. P., & Sharp, P. J. (2001). Distribution and regulation by oestrogen of fully processed and variant transcripts of gonadotropin releasing hormone I and gonadotropin releasing hormone receptor mRNAs in the male chicken. *J Neuroendocrinol*, 13(1), 37-49.
- Sun, Y. M., Flanagan, C. A., Illing, N., Ott, T. R., Sellar, R., Fromme, B. J., . . . Millar, R. P. (2001). A chicken gonadotropin-releasing hormone receptor that confers agonist activity to mammalian antagonists. Identification of D-Lys(6) in the ligand and extracellular loop two of the receptor as determinants. *J Biol Chem*, 276(11), 7754-7761. doi:10.1074/jbc.M009020200
- Sundaram, K., Connell, K. G., Bardin, C. W., Samojlik, E., & Schally, A. V. (1982). Inhibition of pituitary-testicular function with [D-Trp6] luteinizing hormone-releasing hormone in rhesus monkeys. *Endocrinology*, 110(4), 1308-1314. doi:10.1210/endo-110-4-1308
- Taber, E., Claytor, M., Knight, J., Gambrell, D., Flowers, J., & Ayers, C. (1958). Ovarian stimulation in the immature fowl by desiccated avian pituitaries. *Endocrinology*, 62(1), 84-89. doi:10.1210/endo-62-1-84
- Tai, S. S., Xu, B., & Welch, M. J. (2006). Development and evaluation of a candidate reference measurement procedure for the determination of progesterone in human serum using isotope-dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 78(18), 6628-6633. doi:10.1021/ac060936b
- Takahashi, T., & Kawashima, M. (2008). Mesotocin increases the sensitivity of the hen oviduct uterus to arginine vasotocin. *Poult Sci*, 87(10), 2107-2111. doi:10.3382/ps.2008-00076
- Tanaka, K., & Nakada, T. (1974). Participation of the ovarian follicle in control of time oviposition in the domestic fowl. *Poult Sci*, 53(6), 2120-2125. doi:10.3382/ps.0532120
- Tanaka, K., & Yoshioka, S. (1967). Luteinizing hormone activity of the hen's pituitary during the egg-laying cycle. *General and Comparative Endocrinology*, 9(3), 374-379. doi:[https://doi.org/10.1016/0016-6480\(67\)90033-0](https://doi.org/10.1016/0016-6480(67)90033-0)

- Taya, K., Kaneko, H., Takedomi, T., Kishi, H., & Watanabe, G. (1996). Role of inhibin in the regulation of FSH secretion and folliculogenesis in cows. *Animal Reproduction Science*, 42(1), 563-570. doi:[https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01532-1](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01532-1)
- Teng, C. S. (1987). Quantification of mullerian inhibiting substance in developing chick gonads by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Dev Biol*, 123(1), 255-263.
- Thompson, I. R., & Kaiser, U. B. (2014). GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression. *Mol Cell Endocrinol*, 385(1-2), 28-35. doi:10.1016/j.mce.2013.09.012
- Tilly, J. L., Kowalski, K. I., & Johnson, A. L. (1991). Stage of ovarian follicular development associated with the initiation of steroidogenic competence in avian granulosa cells. *Biol Reprod*, 44(2), 305-314.
- Tilly, J. L., Kowalski, K. I., Johnson, A. L., & Hsueh, A. J. (1991). Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, 129(5), 2799-2801. doi:10.1210/endo-129-5-2799
- Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, H., Fujisawa, Y., Kikuchi, M., . . . Sharp, P. J. (2000). A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun*, 275(2), 661-667. doi:10.1006/bbrc.2000.3350
- Tsutsui, K., Ubuka, T., Bentley, G. E., & Kriegsfeld, L. J. (2012). Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): discovery, progress and prospect. *Gen Comp Endocrinol*, 177(3), 305-314. doi:10.1016/j.ygcen.2012.02.013
- Tsutsui, K., Ubuka, T., Bentley, G. E., & Kriegsfeld, L. J. (2013). Review: regulatory mechanisms of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) synthesis and release in photoperiodic animals. *Front Neurosci*, 7, 60. doi:10.3389/fnins.2013.00060
- Tulsiani, D. R., Abou-Haila, A., Loeser, C. R., & Pereira, B. M. (1998). The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res*, 240(2), 151-164. doi:10.1006/excr.1998.3943
- Ubuka, T., Bentley, G. E., & Tsutsui, K. (2013). Neuroendocrine regulation of gonadotropin secretion in seasonally breeding birds. *Front Neurosci*, 7, 38. doi:10.3389/fnins.2013.00038

- Ubuka, T., Bentley, G. E., Ukena, K., Wingfield, J. C., & Tsutsui, K. (2005). Melatonin induces the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in the avian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(8), 3052-3057. doi:10.1073/pnas.0403840102
- Ubuka, T., Son, Y. L., Tobari, Y., Narihiro, M., Bentley, G. E., Kriegsfeld, L. J., & Tsutsui, K. (2014). Central and direct regulation of testicular activity by gonadotropin-inhibitory hormone and its receptor. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 5, 8. doi:10.3389/fendo.2014.00008
- Ubuka, T., Ukena, K., Sharp, P. J., Bentley, G. E., & Tsutsui, K. (2006). Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits gonadal development and maintenance by decreasing gonadotropin synthesis and release in male quail. *Endocrinology*, 147(3), 1187-1194. doi:10.1210/en.2005-1178
- Vatnik I., F. S. (1998). Incubation temperature of the pigeon embryo (*Columba livia*). *J. Therm. Biol.*(239), 53-57.
- Vilchez-Martinez, J. A., Pedroza, E., Arimura, A., & Schally, A. V. (1979). Paradoxical effects of D-Trp6-luteinizing hormone-releasing hormone on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in immature female rats. *Fertil Steril*, 31(6), 677-682.
- Vucicevic, M., Stevanov-Pavlovic, M., Stevanovic, J., Bosnjak, J., Gajic, B., Aleksic, N., Stanimirovic, Z. (2012) Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing. *Zoo Biol.* 32(3) 269-76. doi: 10.1002/zoo.21010.
- Wakabayashi, S., Kikuchi, M., Wada, M., Sakai, H., & Ishii, S. (1992). Induction of ovarian growth and ovulation by administration of a chicken gonadotrophin preparation to Japanese quail kept under a short-day regimen. *Br Poult Sci*, 33(4), 847-858. doi:10.1080/00071669208417526
- Walsh, G., & Jefferis, R. (2006). Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotechnol*, 24(10), 1241-1252. doi:10.1038/nbt1252
- Wells, J. W., Walker, M. A., Culbert, J., & Gilbert, A. B. (1985). Comparison of the response in vivo to luteinizing hormone and follicle stimulating hormone of the granulosa of six follicles from the ovarian hierarchy in the chicken (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol*, 59(3), 369-374.

- Wentworth, B. C., & Mellen, W. J. (1963). Egg production and fertility following various methods of insemination in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J Reprod Fertil*, 6, 215-220.
- Wide, L., Eriksson, K., Sluss, P. M., & Hall, J. E. (2009). Serum half-life of pituitary gonadotropins is decreased by sulfonation and increased by sialylation in women. *J Clin Endocrinol Metab*, 94(3), 958-964. doi:10.1210/jc.2008-2070
- Wilson, J. M., Jones, A. L., Moore, K., Looney, C. R., & Bondioli, K. R. (1993). Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle stimulating hormone. *Animal Reproduction Science*, 33(1), 71-82. doi:[https://doi.org/10.1016/0378-4320\(93\)90107-3](https://doi.org/10.1016/0378-4320(93)90107-3)
- Wilson, S. C., & Sharp, P. J. (1976). Induction of luteinizing hormone release by gonadal steroids in the ovariectomized domestic hen. *J Endocrinol*, 71(1), 87-98.
- Wishart, G. J. (1997). Quantitative aspects of sperm:egg interaction in chickens and turkeys. *Anim Reprod Sci*, 48(1), 81-92.
- Woods, D. C., Haugen, M. J., & Johnson, A. L. (2007). Actions of epidermal growth factor receptor/mitogen-activated protein kinase and protein kinase C signaling in granulosa cells from *Gallus gallus* are dependent upon stage of differentiation. *Biol Reprod*, 77(1), 61-70. doi:10.1095/biolreprod.106.059394
- Woods, D. C., & Johnson, A. L. (2005). Regulation of follicle-stimulating hormone-receptor messenger RNA in hen granulosa cells relative to follicle selection. *Biol Reprod*, 72(3), 643-650. doi:10.1095/biolreprod.104.033902
- Xu, J., Gao, X., Li, X., Ye, Q., Jebessa, E., Abdalla, B. A., & Nie, Q. (2017). Molecular characterization, expression profile of the FSHR gene and its association with egg production traits in muscovy duck. *J Genet*, 96(2), 341-351.
- Yao, H. H., & Bahr, J. M. (2001). Chicken granulosa cells show differential expression of epidermal growth factor (EGF) and luteinizing hormone (LH) receptor messenger RNA and differential responsiveness to EGF and LH dependent upon location of granulosa cells to the germinal disc. *Biol Reprod*, 64(6), 1790-1796.
- Yoshida, H., Takakura, N., Kataoka, H., Kunisada, T., Okamura, H., & Nishikawa, S. I. (1997). Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev Biol*, 184(1), 122-137. doi:10.1006/dbio.1997.8503

- Yoshimura, M., & Hershman, J. M. (1995). Thyrotropic action of human chorionic gonadotropin. *Thyroid*, 5(5), 425-434. doi:10.1089/thy.1995.5.425
- Yoshimura, T., Yasuo, S., Watanabe, M., Iigo, M., Yamamura, T., Hirunagi, K., & Ebihara, S. (2003). Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature*, 426(6963), 178-181. doi:10.1038/nature02117
- You, S., Bridgham, J. T., Foster, D. N., & Johnson, A. L. (1996). Characterization of the chicken follicle-stimulating hormone receptor (cFSH-R) complementary deoxyribonucleic acid, and expression of cFSH-R messenger ribonucleic acid in the ovary. *Biol Reprod*, 55(5), 1055-1062.
- You, S., Foster, L. K., Silsby, J. L., el Halawani, M. E., & Foster, D. N. (1995). Sequence analysis of the turkey LH beta subunit and its regulation by gonadotrophin-releasing hormone and prolactin in cultured pituitary cells. *J Mol Endocrinol*, 14(1), 117-129.
- Zakar, T., & Hertelendy, F. (1980). Effects of mammalian LH, cyclic AMP and phosphodiesterase inhibitors on steroidogenesis, lactate production, glucose uptake and utilization by avian granulosa cells. *Biol Reprod*, 22(4), 810-816.
- Zhang, C., Shimada, K., Saito, N., & Kansaku, N. (1997). Expression of messenger ribonucleic acids of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in granulosa and theca layers of chicken preovulatory follicles. *Gen Comp Endocrinol*, 105(3), 402-409. doi:10.1006/gcen.1996.6843
- Zhao, J. M., Han, Z. M., & Sun, Y. H. (2017). Is embryonic hypothermia tolerance common in birds? *Biol Lett*, 13(4). doi:10.1098/rsbl.2016.0967
- Zheng, X., O'Connor, J., Huchzermeyer, F., Wang, X., Wang, Y., Wang, M., & Zhou, Z. (2013). Preservation of ovarian follicles reveals early evolution of avian reproductive behaviour. *Nature*, 495(7442), 507-511. doi:10.1038/nature11985