



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

**IZTACALA**

U. N. A. M.

Características Endocrinas de las Células  
Foliculares del Ovario de Aves en Cultivo

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

PRESENTA

Esperanza García Martínez



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

A MIS HIJOS: FEDERICO Y CARLOS

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO CON LA ASESORIA DE LA DRA. MARTA ROMANO PARDO, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA, BIOFISICA Y NEUROCIENCIAS DEL CINVESTAV, I.P.N.

MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO A TODO EL PERSONAL DEL LABORATORIO, POR SU COLABORACION Y SUS ENSEÑANZAS.

POR SU SOLIDARIDAD Y APOYO CONTINUO, GRACIAS A: MARTA, GRACIELA, PATY, CAROLINA, MARCIA, MALU, LAURA, RAUL, ARTURO, SILVIA, JUSTO, ROGELIO Y HORTENSIA.

CARACTERISTICAS ENDOCRINAS DE LAS CELULAS FOLICULARES  
DEL OVARIO DE AVES EN CULTIVO.

INTRODUCCION

ASPECTOS GENERALES.

En la mayoría de las aves el desarrollo del tracto genital es asimétrico y normalmente sólo maduran el ovario y el oviducto del lado izquierdo (Follet, 1984). El ovario funcional de la gallina doméstica se encuentra situado en el lado izquierdo del cuerpo, en el extremo cefálico del riñón y se une a la pared corporal por el ligamento mesovarico (Sturkie, 1976).

La morfología del ovario maduro en las aves depende de los ciclos reproductivos de cada especie; en general no contiene ovogonias ya que en las aves la ovogénesis se completa antes del nacimiento y pueden observarse ovocitos previtelogénicos, vitelogénicos o atrésicos. Los folículos ováricos se encuentran inmersos en el estroma que, en la gallina, está constituido por una red de tejido conectivo que contiene lagunas de gran tamaño y una enorme cantidad de vasos sanguíneos y fibras nerviosas (Dodd, 1977).

En las gallinas sexualmente maduras, los folículos alcanzan un diámetro aproximado de 40 mm antes de la

ovulación; el rápido crecimiento, producido por la acumulación de vitelo, provoca que el ovocito sobresalga de la superficie del ovario y finalmente se desarrolle un pedúnculo.

Los folículos preovulatorios del ovario de aves no maduran sincrónicamente, sino que se establece una graduación del desarrollo que se conoce como jerarquía folicular según la cual el folículo de mayor tamaño es el destinado a liberar el ovocito.

La liberación del óvulo se produce por la ruptura de la membrana folicular a nivel del estigma, un área relativamente avascular localizada en el polo opuesto del pedúnculo folicular en la que se adelgaza la pared del folículo debido a la ausencia de tejido conectivo (Sturkie, 1976).

Desde 1925 Brambell observó que una gran cantidad de folículos previtelogénicos en el ovario de la gallina sufren atresia antes de alcanzar un diámetro de 400 micras.

Aparentemente, el destino de tales folículos depende del grado de desarrollo que hallan alcanzado al iniciarse la atresia; los más pequeños son reabsorbidos *in situ*, otros pueden romperse y liberar su contenido en las lagunas del estroma (el detritus resultante es eliminado por fagocitos y

leucocitos), mientras que el verdadero cuerpo atrésico se forma cuando las células del epitelio folicular invaden y fagocitan al ovocito en desarrollo (Brambell, 1956).

En las aves, los folículos postovulatorios no se transforman en una estructura con actividad endócrina semejante al cuerpo lúteo de los mamíferos (Wyburn y cols., 1966). Actualmente se acepta que las estructuras postovulatorias son transitorias y desaparecen aproximadamente 10-14 días después de la ovulación (Dodd, 1977).

Sin embargo, los folículos postovulatorios mantienen cierta capacidad esteroidogénica durante las 24 horas siguientes a la ovulación (Armstrong y cols., 1977) y su extirpación interfiere con la oviposición (Gilbert, Davidson y Wells, 1978) y modifica la conducta de anidación (Follet, 1984).

## HISTOLOGÍA Y ULTRAESTRUCTURA

La capa externa del ovocito se denomina membrana vitelina y es una lámina fibrosa rodeada por la zona radiada, cuyo espesor es de 5 micras (Wyburn y cols., 1965; ver Figura 1). Inmediatamente se encuentra la zona pelúcida o membrana perivitelina, posiblemente secretada por las células de la granulosa (células foliculares) que

constituyen el epitelio que rodea al ovocito (Bellairs, 1965).

El epitelio folicular consta de una sola capa de células cuboidales en los folículos más pequeños y en los de mayor tamaño, mientras que el epitelio que rodea ovocitos de tamaño intermedio (0.4-4 mm) tiene una apariencia columnar pseudoestratificada (Bellairs, 1965). Las células del epitelio folicular tienen una superficie lisa interrumpida por zonas en que se localizan proyecciones de una célula a otra y hacia la membrana vitelina (Figura 1); en dichas zonas se observan especializaciones de la membrana llamadas transomas, que podrían estar asociadas con la formación de vitelo (Hodges, 1974).

En 1971, Dahl reportó que las células de la granulosa se asocian entre sí y con el ovocito a través de desmosomas. Este mismo autor estudió el efecto de inyecciones intramusculares sucesivas de estradiol y progesterona sobre las características ultraestructurales de la granulosa, y observó un alargamiento celular y un aumento en el tamaño del aparato de Golgi, en el número de mitocondrias y en la superficie del retículo endoplásmico rugoso (Dahl, 1971b).

Más recientemente se han observado cambios en la ultraestructura de las células de la granulosa, asociados con la síntesis de esteroides, antes y después de la

ovulación. Estos cambios incluyen la aparición de crestas tubulares, la elongación y aumento en el número de las crestas lamelares de la mitocondria y la distribución de pequeños complejos de Golgi dispersos en todo el citoplasma, aproximadamente una hora antes de la ovulación (Kohsaka e Ishida, 1980). Las crestas tubulares desaparecen durante las cinco horas posteriores a la ovulación, mientras que las crestas lamelares disminuyen y el aparato de Golgi se reorganiza durante un período de 5-50 horas después de la ovulación (Kohsaka e Ishida, 1980).

Según Bellairs (1965) la membrana basal que separa a las células de la granulosa de las tecaes es de aproximadamente una micra de espesor.

La teca interna es una capa celular compacta derivada del tejido conectivo del estroma, en la que pueden identificarse tres regiones: una interna, constituida por fibras de colágena, una intermedia de fibroblastos, y una externa compuesta por células vacuoladas, que posiblemente constituyen la glándula tecal (Dodd, 1977; Wyburn y cols., 1965).

La teca externa constituye la mayor parte de la pared folicular (Hodges, 1974) y en ella se observan fibroblastos inmersos en fibras de colágena, rodeados por una cápsula de tejido conectivo y músculo liso.

A pesar de que los estudios de la histología del ovario de la gallina doméstica han permitido asegurar la presencia de músculo liso en la pared folicular, existen desacuerdos en cuanto a su distribución. En la década de los años 30s se pensaba que el estigma de los folículos preovulatorios estaba compuesto principalmente por fibras de músculo liso; posteriormente se describió una envoltura muscular originada en el pedúnculo folicular, que cubría el hemisferio proximal del mismo. En dicha envoltura las células musculares se orientan en forma radial, meridionalmente (Schroeder & Talbot, 1985). De acuerdo con los estudios fisiológicos (Soliman & Walker, 1976) y de ultraestructura, parece ser que las aves poseen un sistema tecal contráctil complementado por músculo liso extrafolicular necesario para expulsar ovocitos de gran tamaño (Schroeder & Talbot, 1985).

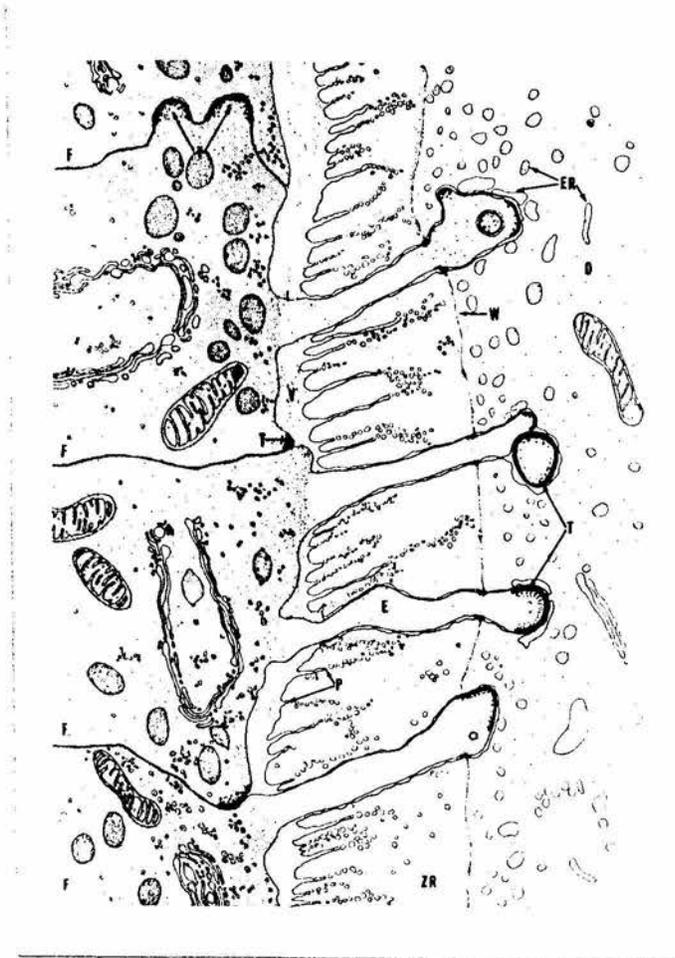


Figura 1. Esquema que muestra las prolongaciones de la superficie apical del epitelio folicular hacia el ovocito, la membrana vitelina (v), la zona radiada (zr) y los transosomas (T). Tomada de Press (1964).

Finalmente, el ovario está cubierto por el epitelio germinal; este epitelio está constituido por una monocapa de células cuboidales y tiene un espesor de 5 micras. En aquellas zonas en que el rápido crecimiento del ovocito ejerce presión sobre el epitelio, las células se aplanan adquiriendo una forma escamosa en los folículos maduros.

Por debajo del epitelio germinal hay una capa de tejido conectivo que constituye la túnica albugínea, que a su vez rodea al estroma ovarico, de aspecto esponjoso. En el estroma, se encuentran incluidos acumulos de células intersticiales con aspecto poligonal y numerosas inclusiones de lípidos en su citoplasma; Narbaitz y de Robertis (1968) han propuesto que dichas células se derivan de la médula del ovario embrionario.

## ESTEROIDES DEL OVARIO

En el ovario de la gallina doméstica las reacciones histoquímicas que indican una función esteroideogénica difieren cualitativamente entre animales con ciclos de oviposición regulares y los que se encuentran en período de muda. Aparentemente en las gallinas ponedoras la esteroideogénesis se realiza en las células tecales y de la granulosa; en las no ponedoras esta función se realiza en la teca y el estroma, siendo sus productos principales

androstenediona (54%), testosterona (6%) y  $17\beta$ -estradiol (4%).

Estas observaciones fueron realizadas por Boucek y Savard (1970) en rebanadas de tejido ovárico (de 0.5 mm de espesor) incubadas con acetato- $1-C^{14}$ . De acuerdo con sus resultados, las gallinas ponedoras sintetizan cantidades equivalentes de progesterona, andrógenos y estrógenos, mientras que las gallinas en periodo de muda sintetizan una gran proporción de esteroides androgénicos.

En general, los productos principales de la actividad endócrina del ovario de la gallina doméstica adulta son progesterona, testosterona y estrógenos. En 1971, Gilbert propuso que los distintos tipos celulares del folículo secretan estos esteroides de la siguiente manera: las células intersticiales del estroma, andrógenos; las células tecales, estrógenos y las células de la granulosa del folículo postovulatorio, progesterona (Hodges, 1974).

Desde 1975, Shahabi, Norton y Nalbandov estudiaron la posibilidad de que solamente los folículos más desarrollados en la jerarquía intervinieran en la retroalimentación del eje hipotálamo-hipofisario para regular la liberación de las hormonas ovulatorias (gonadotropinas) en la gallina doméstica.

En torno a estas ideas surgieron problemas de gran interés en el campo, tales como: a) existe realmente una diferencia en la actividad endócrina de los diferentes tipos celulares del folículo?, b) cuales son los mecanismos de síntesis de esteroides?, c) existe una regulación intrafolicular de la síntesis de esteroides?, y d) que función desempeñan los productos de secreción del ovario en la regulación de la hipófisis?.

De acuerdo con los estudios de Huang y Nalbandov (1979a) las células de la granulosa del ovario de la gallina, aisladas de folículos pre o postovulatorios, sintetizan espontáneamente grandes cantidades de progesterona y muy poca testosterona. Sin embargo, las gonadotropinas endógenas sólo afectan la síntesis de progesterona en las células de los folículos preovulatorios maduros.

Al estudiar la esteroidogénesis en el segundo y el tercer folículo de la jerarquía, Shahabi y cols. (1975) observaron que la producción de testosterona y estrógenos era mayor que en los primeros folículos de la secuencia; la síntesis de dichos esteroides es estimulada al administrar hormona luteinizante (LH).

Dada la posibilidad de una interacción entre la función endócrina de los diferentes tipos celulares de la pared

folicular. Huang y Naibandov (1979a) estudiaron el (los) sitio(s) de síntesis de esteroides, usando suspensiones celulares de diferentes folículos. Estos autores mostraron que existe una compartimentalización de la secreción: la progesterona proviene de las células de la granulosa, mientras que las células de la teca producen testosterona y estrógenos a partir de sus precursores progesterona y testosterona, respectivamente.

Huang y Naibandov (1979b) propusieron un modelo para la síntesis de esteroides en el folículo de la gallina según el cual hay una interacción entre la teca y la granulosa. Según esta hipótesis, las células de la granulosa producen progesterona que difunde hacia la teca donde es aromatizada a testosterona y a estrógenos (Figura 2).

Esto significa que, a diferencia de los mamíferos, el folículo ovarico de las aves (particularmente de la gallina doméstica) representa un sistema relativamente sencillo de esteroidogénesis en el que la granulosa es el principal productor de progesterona y la teca es la única fuente de andrógenos y estrógenos (Marrone & Hertelendy, 1983a).

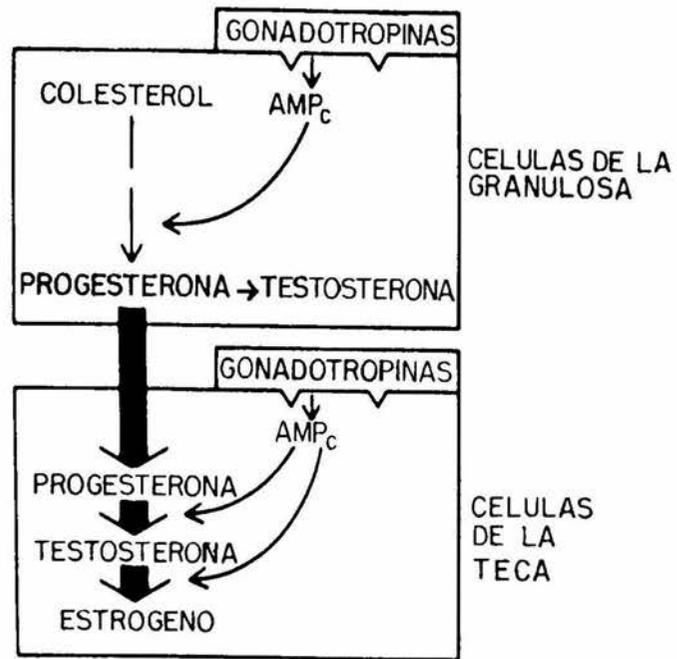


Figura 2. Modelo de la síntesis compartamentalizada de esteroides en el ovario de aves. Se indica la producción secundaria de testosterona en las células de la granulosa, y la utilización de la progesterona como precursor de estrógenos en las células tecales. Tomada de Huang y cols. (1979).

Por esta razón, el estudio de los cambios en la capacidad de responder a gonadotropinas en las células de la granulosa, así como la dependencia de la disponibilidad de los precursores de la esteroidogénesis en cada compartimiento del folículo en función de la madurez folicular han sido objeto de numerosos trabajos en años recientes.

Por otra parte parece ser que conforme los folículos del ovario de la gallina maduran, la actividad enzimática asociada con la esteroidogénesis disminuye en las células tecales y aumenta progresivamente en las de la granulosa (Follet, 1984) lo cual explicaría que en los folículos maduros sea mucho mayor la producción de progesterona que la de los otros esteroides sexuales.

La progesterona es el factor principal en la retroalimentación positiva que desencadena la liberación de hormona luteinizante (LH) en la gallina (Tanaka y Kamiyoshu, 1980), lo que explica que su secreción estuviese confinada a los folículos maduros. Según Follet (1984), el cambio en la actividad endócrina del ovario se refleja en una modificación de los niveles plasmáticos de esteroides. La vitelogénesis es un proceso dependiente de estrógenos por lo que dichos esteroides se requieren mucho antes de la ovulación.

Se ha observado que la concentración folicular de esteroides cambia durante la fase de crecimiento folicular. Según Armstrong (1982) este cambio puede deberse a variaciones en la estimulación por gonadotropinas, ya sea por alteraciones en el flujo sanguíneo de cada uno de los folículos o por cambios en el número o el tipo de receptores a gonadotropinas; la consecuencia de tales variaciones se refleja en cambios en la actividad enzimática de las células esteroidogénicas a lo largo del desarrollo.

Más aun, la actividad de la  $3\beta$ -hidroxil- $\Delta^5$ -esteroide deshidrogenasa es máxima en los folículos más grandes de la jerarquía (Armstrong, 1982).

Sin embargo, los estudios de Marrone y Hertelendy (1983a) indican que las células de la granulosa de folículos inmaduros pueden convertir el 100% de la pregnenolona en progesterona lo cual sugiere que el cambio en la producción de esta hormona conforme maduran los folículos es el resultado de un aumento progresivo en la sensibilidad a gonadotropinas, posiblemente debido a la adquisición de receptores a LH, más que a algún cambio en la capacidad sintética. En cambio, en las células de la teca se observa una pérdida de actividad de la aromatasa así como en la sensibilidad a LH, asociadas con la maduración de los folículos preovulatorios (Marrone y Hertelendy, 1983a y b).

El principal andrógeno producido por las células de la teca es la androstenediona (Llewelyn, 1981; Marrone y Hertelendy, 1983b).

Según Marrone y Hertelendy (1983b) la progesterona producida por las células de la granulosa, en respuesta a la estimulación con gonadotropinas, es metabolizada por la teca a androstenediona, 17-hidroxiprogestero, testosterona y estrógenos; sin embargo, las células tecales aisladas pueden producir pequeñas cantidades de progesterona en respuesta a LH, y la granulosa puede convertir progesterona en androstenediona en forma secundaria.

En el folículo postovulatorio la hormona principal es la progesterona, tanto en las células de la granulosa como en las tecales (Dick y cols., 1978); existe también cierta cantidad de androstenediona y testosterona en ambos tipos celulares 1 a 2 horas después de la ovulación, pero el contenido de estas hormonas es muy variable. Los estrógenos, en cambio, aumentan de manera clara aunque transitoria entre las 20 y las 27 horas después de la ovulación.

Dick y cols. (1978) observaron una disminución en el contenido de progesterona en las células de folículos postovulatorios durante las primeras 15 horas después de la ovulación y asociaron esta disminución con el cambio en la actividad de la enzima  $3\beta$ -hidroxi- $\Delta^4$ -esteroido

deshidrogenasa reportado por Armstrong y cols (1977), debido a que las células se mantenían viables hasta por 5 días y por tanto los cambios en la producción de progesterona no podrían atribuirse a muerte celular.

#### **CICLO OVULATORIO.**

Debido a que la síntesis de vitelo es un proceso energéticamente costoso, el número de folículos en la jerarquía, el tamaño de cada folículo en relación al peso corporal y los intervalos entre ovulaciones sucesivas varía según la especie y depende de las adaptaciones ecológicas de las aves (Follet, 1984). Muchas especies domésticas ovulan diariamente durante varios días consecutivos; esta secuencia se interrumpe durante uno o más días antes de reiniciar el ciclo (Sturkie, 1976).

Diferentes autores han mostrado que existe una relación entre la ovulación y la oviposición (Sturkie, 1976). En la gallina la ovulación ocurre de 15 a 75 minutos después de la oviposición (Follet, 1984) y el ciclo ovulatorio completo dura aproximadamente 24 hrs.

La variación de los niveles hormonales en el plasma de la gallina doméstica a lo largo del ciclo ovulatorio incluye un pico de LH de 6 a 8 horas antes de la ovulación (Tanaka y Kamiyoshu, 1980); algunos autores han reportado que este

nivel máximo ocurre de 4 a 6 horas antes de la ovulación (Wilson y Sharp, 1973; Furr y cols., 1973). Los niveles más altos de testosterona parecen coincidir o preceder ligeramente a este pico de LH (Etches y Cunningham, 1977; Williams y Sharp, 1978), (Fig.3).

La progesterona exógena provoca un aumento en los niveles de LH (Wilson y Sharp, 1975). Bonney y cols. (1974) han propuesto que el efecto regulador de la progesterona se produce a nivel hipotalámico, lo cual está de acuerdo con los experimentos de Ralph y Fraps (1960) en los que la inyección de pequeñas cantidades de progesterona en la región preóptica del hipotálamo provoca la ovulación prematura, mientras que al aplicarla en hipófisis no se observa efecto.

La hipótesis más aceptada de la regulación del pico ovulatorio de LH es que la progesterona actúa sobre el sistema hipotálamo-hipófisis, sensibilizado por estrógenos y progesterona, provocando un máximo en la liberación de LH del cual depende la ovulación (Sharp, 1981).

Aún no existe acuerdo acerca de las fluctuaciones de estrógenos a lo largo del ciclo, pero algunos autores reportan un pico preovulatorio casi simultáneo al de LH (Tanaka y Kamiyoshu, 1980) y otros aceptan además un aumento posterior a la ovulación (Follet, 1984). Sin embargo, según

Etches y Cunningham (1977) los cambios en las concentraciones plasmáticas de testosterona son imágenes especulares de los cambios en estradiol durante el ciclo ovulatorio de la gallina (Fig. 3).

El crecimiento de los folículos del ovario se produce como respuesta a la liberación de hormona foliculoestimulante (FSH) y de LH; la administración de estas hormonas en el animal integro evita la jerarquía y produce ovulaciones múltiples (Opel y Naibandov, 1961a y b).

Existen pocos datos en la literatura acerca de los niveles plasmáticos de FSH durante el ciclo ovulatorio de la gallina. Imai y Naibandov (1971) y Scanes y cols. (1977) han reportado un pico de FSH aproximadamente 14 hrs antes de la ovulación, pero parece ser que la concentración de esta hormona es relativamente constante a lo largo del ciclo.

En general los mecanismos endócrinos que regulan la ovulación en distintas especies de aves dependen de los ciclos luz-oscuridad. Existe la posibilidad de que el ligero aumento en los andrógenos plasmáticos que se observa al comenzar el periodo de oscuridad tenga un efecto de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo (Tanabe y Nakamura, 1980), impidiendo el aumento en la liberación de hormona liberadora de gonadotropinas y consecuentemente de LH durante las primeras seis horas de oscuridad.

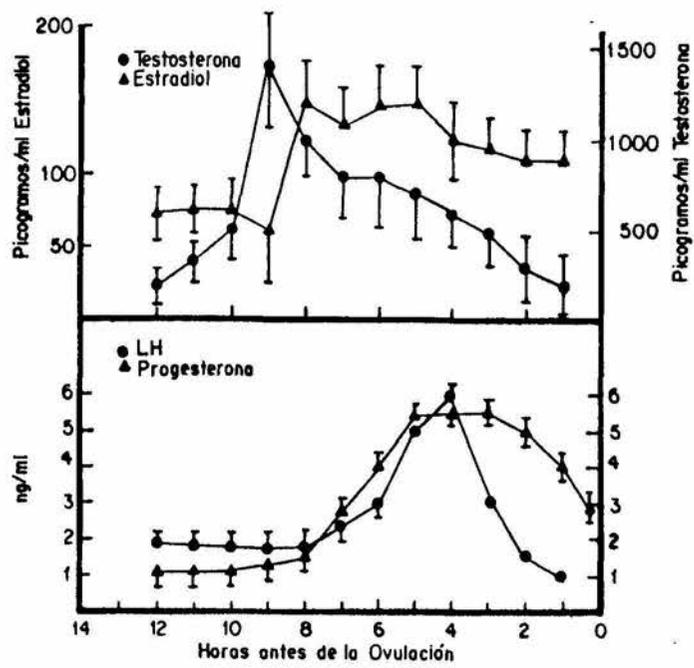


Figura 3. Variación de los niveles hormonales en el plasma de la gallina doméstica, durante el ciclo ovulatorio. Tomada de Lance y Callard (1977).

## ESTIMULACION DE LA SINTESIS DE PROGESTERONA. NUCLEOTIDOS CICLICOS.

Si bien actualmente se acepta que en los vertebrados inferiores las gonadotropinas controlan la función gonadal, aun no existe acuerdo acerca de la importancia relativa de LH y FSH en el control de la esteroidogénesis ovarica en diferentes especies.

En anfibios la LH parece ser la gonadotropina que estimula principalmente la secreción de progesterona (Licht y Crews, 1976), mientras que en reptiles tanto la FSH como la LH aumentan la producción de progesterona de los folículos preovulatorios (Lance y Callard, 1978).

En este sentido, Scanes y Fagioli (1980) mostraron que la LH de mamíferos es más efectiva que la FSH para incrementar la secreción de progesterona en aves (2.3 a 3.8 veces la producción basal); estos autores consideraron que en los estudios en los que una dosis elevada de FSH (10 ug/ml) estimulaba la producción de progesterona en células de la granulosa de la gallina (Huang y Nalbandov 1979a y b), la fracción de FSH podría haber estado contaminada con LH.

De cualquier manera, parece ser que la LH de aves y la LH de ovino son "equipotentes", mientras que la FSH de gallina es más efectiva que la FSH de mamíferos en la

estimulación de la esteroidogénesis (Scanes y Fagioli, 1980).

Estas observaciones aparentemente contradictorias parecen resolverse con los trabajos de Hammond y cols. (1981) en los que se demuestra que la FSH de aves y la de mamíferos inducen respuestas similares en la producción de progesterona de células obtenidas de folículos inmaduros. Durante los 3 a 4 días previos a la ovulación, hay un enorme incremento en la producción de progesterona estimulada por LH; este aumento se ve acompañado por una rápida disminución en la respuesta a FSH, hasta llegar a una completa refractoriedad en las células de la granulosa del folículo preovulatorio maduro, posiblemente debida a la ausencia de receptores funcionales.

De este modo parece ser que, al igual que en mamíferos, conforme las células maduran hay un aumento en los sitios de unión para LH y en la actividad del sistema adenilato ciclasa, mientras que la respuesta esteroidogénica hacia FSH desaparece gradualmente, quedando la influencia reguladora de LH (Hammond y cols., 1981).

En 1980, Hammond y cols. estudiaron el mecanismo mediante el cual las gonadotropinas estimulan la síntesis de progesterona en células de la granulosa de la gallina doméstica. De acuerdo con sus resultados, la LH de bovino

induce la producción de progesterona de dichas células aún cuando no detectan un aumento en la concentración de adenosin monofosfato cíclico (AMPC). Sin embargo, obtuvieron evidencias indirectas de que este nucleótido actúa como mediador intracelular en la esteroidogénesis estimulada por gonadotropinas: la teofilina (un inhibidor de la fosfodiesterasa) potencia la producción de progesterona inducida por LH mientras que la heparina (que inhibe la adenilato ciclasa) suprime el efecto de la LH. Por otra parte, el dibutiril AMPC induce la síntesis de progesterona en forma dependiente de la dosis, simulando el efecto de la LH.

Mori y cols. (1985) mostraron que el dibutiril AMPC estimula la producción de progesterona de los folículos preovulatorios maduros de codorniz, pero reportan que en los folículos inmaduros la producción de esta hormona es un proceso autónomo, es decir, independiente de nucleótidos.

De este modo, se ha propuesto que solo una pequeña fracción de AMPC intracelular desempeña una función importante en la esteroidogénesis en el ovario de la gallina.

Las observaciones de Hammond y cols. (1980) dieron lugar a una serie de estudios orientados a medir en forma directa la actividad de la adenilato ciclasa (AC) de las

células de la granulosa durante el ciclo ovulatorio, y a investigar si el sistema AC se desensibiliza después que ha ocurrido el nivel máximo de LH endógena, como se observa en los mamíferos.

Según Calvo y cols. (1981) la magnitud de la respuesta del sistema AC depende de la maduración folicular, lo cual podría asociarse con un incremento en los sitios receptores; estos autores observaron que el sistema AC es estimulado por LH y no por FSH. Posiblemente en las aves la FSH tenga un efecto principalmente gametogénico y la LH sea esteroidogénica.

La actividad de AC en los diferentes folículos preovulatorios en la gallina llega a un máximo antes del pico de LH, después del cual disminuye. Calvo y cols. (1981) no observaron desensibilización en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios de la gallina, lo cual está de acuerdo con los estudios de Wells y cols. (1980) en los que las células aisladas del folículo preovulatorio más desarrollado después del pico endógeno de LH, e incubadas con esta hormona (1.25 microgramos/ml) durante 24 horas, aún sintetizan progesterona.

La actividad de la adenilato ciclasa del folículo postovulatorio cambia de manera diferente a la de los folículos preovulatorios: dos horas después de la ovulación,

el sistema AC es altamente sensible a LH pero a las 6 horas disminuye su actividad, lo cual puede indicar desensibilización o bien muerte celular (Calvo y cols., 1981).

## ANTECEDENTES

La mayor parte de la información acerca de la función endócrina del ovario de la gallina doméstica se ha obtenido en estudios *in vivo*, en los que la interpretación de los resultados se complica por la interacción de las glándulas endócrinas con hígado, riñón, etc., o bien *in vitro* usando rebanadas de tejido o suspensiones celulares.

La técnica de cultivo de tejidos para el estudio de la esteroidogénesis en los mamíferos ha permitido avances importantes en el conocimiento de los sistemas enzimáticos involucrados, así como en los mecanismos que regulan la secreción de las diferentes hormonas del ovario. Por lo tanto, resulta interesante mantener células del ovario de aves en cultivo para controlar las condiciones en las que se desarrollan los diferentes tipos celulares del folículo y analizar los factores que modifican la función esteroidogénica de los mismos, en poblaciones celulares enriquecidas.

En este sentido, el presente trabajo se ha orientado al estudio de un solo tipo celular en cultivo: las células de la granulosa, que son las principales productoras de progesterona. Se contempla realizar más adelante el estudio de las células tecaes.

## OBJETIVOS

El objetivo general es la caracterización funcional de las células de la granulosa del ovario de la gallina doméstica.

Los objetivos particulares son los siguientes:

- 1.- Obtener cultivos de células de la granulosa de folículos preovulatorios y postovulatorios.
- 2.- Conocer el tiempo de incubación necesario para que las células foliculares produzcan un máximo de secreción de progesterona.
- 3.- Estudiar la capacidad de respuesta a las gonadotropinas en las diferentes etapas de la maduración folicular, estimulando con diferentes dosis de GCh y midiendo la producción de progesterona.
- 4.- Estudiar el efecto del suero bovino fetal que se agrega al medio de cultivo sobre la producción de hormonas esteroides en esta especie, variando la concentración y utilizando también suero sin esteroides.

## MÉTODOS

En el presente trabajo se utilizaron gallinas Rod Island maduras, de 1.8 a 2.5 Kg de peso. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales y se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*. Se eligieron gallinas que presentaban ciclos de oviposición regulares, lo cual se determinó por observación diaria. Después de 1-2 horas a partir de la oviposición, se sacrificaron por decapitación.

Se colectó el ovario en solución salina de Hanks (Jacoby y Pastan, 1979) estéril, con un pH de 7.3-7.4. Posteriormente se disecaron, en una campana de flujo laminar, el folículo postovulatorio más reciente (FO, seleccionado por su alto grado de vascularización) y dos folículos preovulatorios. Los folículos preovulatorios se denominaron como F1, F2, ..., Fn, de acuerdo a su tamaño, siendo F1 el más grande de la jerarquía (aproximadamente 4 cm de diámetro mayor); n depende del número de folículos que pueden diferenciarse como parte de la jerarquía y varía en distintos animales. Para este estudio se usaron el folículo preovulatorio maduro (F1) y el más pequeño de la jerarquía (F5).

Las células de la granulosa se separaron de la teca por disección según la técnica de Gilbert y cols. (1977) para los folículos preovulatorios, y con el método de raspado

descrito por Huang y Nalbandov (1979) para los folículos postovulatorios.

Las células se colectaron en tubos cónicos estériles con 2.0 ml de medio Dulbecco modificado (DMEM), suero bovino fetal (SBF) al 10% y antibiótico (penicilina-estreptomina, y 50 microgramos de gentamicina por mililitro de medio).

En este medio se disoció el tejido mecánicamente con pipetas Pasteur. La suspensión celular que se obtuvo de este modo se filtró con una malla de nylon para separar las células de la granulosa de fragmentos de membrana basal a los que se encuentran adheridas normalmente dichas células.

Se sembraron alícuotas de la suspensión celular (200-300 microlitros) en cajas de plástico o en multicámaras, calidad cultivo de tejidos. Los recipientes se mantuvieron en una incubadora a 37°C en un ambiente húmedo saturado con una mezcla de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 24 hrs se cambió el medio de cultivo.

En algunos experimentos se redujo la concentración de suero bovino fetal a un 5% para evitar un posible efecto inhibitorio del suero sobre la esteroidogénesis. Este fenómeno ha sido observado por Orly, Sato y Erickson (1980) en células de la granulosa de la rata, en cultivo.

Cuarenta y ocho horas después de sembradas las células se realizaron los experimentos que se describen a continuación:

**a) Curvas dosis-respuesta.**

Se incubaron los cultivos durante 3 horas en condiciones basales y con diferentes dosis de gonadotropina coriónica humana (GCh); las dosis que se probaron inicialmente fueron 1, 10 y 50 mU/ml de medio de cultivo.

**b) Cinética.**

Se estimularon las células de los folículos F1 y postovulatorio con una concentración constante de GCh (10 mU/ml para el folículo preovulatorio maduro y 1 mU/ml para el folículo postovulatorio). Se colectó el medio de cultivo a diferentes tiempos: 30, 60, 90, 120 y 180 minutos para medir la concentración de progesterona por radioinmunoanálisis.

No fue posible realizar estos experimentos con el folículo F5 debido a que es difícil obtener suficientes células en la suspensión a partir de folículos tan pequeños.

**c) Efectos del suero.**

Doce horas antes de hacer el cultivo se mezcló suero bovino fetal (SBF, 15 ml) con 75 mg de carbono activado; la mezcla se mantuvo con agitación constante en el cuarto frío. Al día siguiente se centrifugó a 3000 rpm y se eliminó el

precipitado de carbón. El sobrenadante se llamará en adelante suero "lavado".

La suspensión celular se sembró en medio de cultivo con dos concentraciones diferentes de SBF normal y dos de SBF "lavado", distribuyendo las células en la cámara de cultivo de manera que se tuvieran duplicados de cada folículo para cada concentración de suero.

Al día siguiente se cambió el medio reemplazándolo por otro que contenía las mismas concentraciones de suero que el del día anterior. A las 48 horas se incubaron las células durante 90 minutos con las siguientes dosis de GCh para cada folículo:

F1, 10 mU/ml

F5, 50 mU/ml

PO, 1 mU/ml

En el siguiente esquema se observa la distribución de los grupos experimentales:

	I			II		
CONTROL	F1	F5	PO	F1	F5	PO
GCh	F1	F5	PO	F1	F5	PO
	III			IV		
CONTROL	F1	F5	PO	F1	F5	PO
GCh	F1	F5	PO	F1	F5	PO

GRUPO I.	SBF	10%
GRUPO II.	SBF	5%
GRUPO III.	SBF lavado	10%
GRUPO IV.	SBF lavado	5%

Aun cuando se siguió el mismo procedimiento para los tres diferentes folículos estudiados, las células obtenidas del folículo preovulatorio inmaduro (F5) y del postovulatorio (P0) no proliferaron en ausencia de suero bovino fetal, por lo que el material fue insuficiente para la cuantificación de hormonas.

Al finalizar el periodo de incubación se colectó el medio de cultivo para cuantificar la producción de progesterona y la monocapa celular se digirió con NaOH 0.1 M para hacer la determinación de proteínas por el método de Bradford (1976).

Para medir la producción de progesterona se empleó el método de radioinmunoanálisis, siguiendo el protocolo experimental sugerido por la O.M.S. En general el método consistió en lo siguiente: se realizaron dos extracciones del medio de cultivo con éter, separando la fase acuosa de la etérea por congelación con hielo seco y acetona. Se desechó la fase acuosa y la fase etérea se evaporó colocando los tubos en baño María a 35°C en una campana de extracción.

Se agregaron 500 ml de buffer RIA (Ver anexo) para resuspender la fase etérea. El ensayo se hizo por duplicado, incubando las muestras con progesterona tritiada y con anticuerpo anti-progesterona (Radioassay Systems Lab. con un porcentaje de reacción cruzada de 4.1% para desoxicorticosterona y 0.93% para 20-hidroxiprogesterona) durante una hora a 38°C, y una hora a 4°C. Al terminar el periodo de incubación se separó la hormona libre de la hormona que quedó unida al anticuerpo, agregando 200 microlitros de carbón activado 0.8% a cada uno de los tubos. Después de detener la reacción con el carbón, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos y se volcó el sobrenadante en viales limpios a los que se agregaron 5 ml de líquido de centelleo. Las cuentas de radiactividad se determinaron en un contador de centelleo Packard.

Las cuentas por minuto obtenidas permiten estimar la cantidad de hormona marcada que ha sido desplazada por la hormona fría en el tubo problema. La concentración de esta última se calculó a partir de los datos obtenidos con una curva estándar (diferentes concentraciones de hormona fría a una concentración constante de hormona marcada), aplicando el método de análisis de Bedolla Tovar y cols (1984).

## ANEXO

### COMPOSICION DE LAS SOLUCIONES

#### SOLUCION DE HANKS

mmol/l

NaCl	-----	136.89
KCl	-----	5.37
CaCl <sub>2</sub>	-----	0.75
MgSO <sub>4</sub>	-----	0.41
MgCl <sub>2</sub>	-----	0.49
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-----	0.42
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-----	0.44
NaHCO <sub>3</sub>	-----	4.17
Glucosa	-----	5.50

R rojo fenol--0.02 g/l  
pH=7.4 ± 0.05

#### BUFFER RIA

(gramos/litro)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-----	8.7
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-----	5.4
NaCl	-----	7.0
Azida de sodio	-----	1.0
Gelatina	-----	1.0

pH=7.0 ± 0.05

## RESULTADOS

Al probar distintos sustratos (poli-lisina, colágena, vidrio o plástico calidad cultivo de tejidos) no se observaron diferencias significativas en la facilidad con que las células de los diferentes folículos desarrollaban una monocapa, por lo que se decidió emplear cajas desechables de plástico calidad cultivo de tejidos para realizar los experimentos.

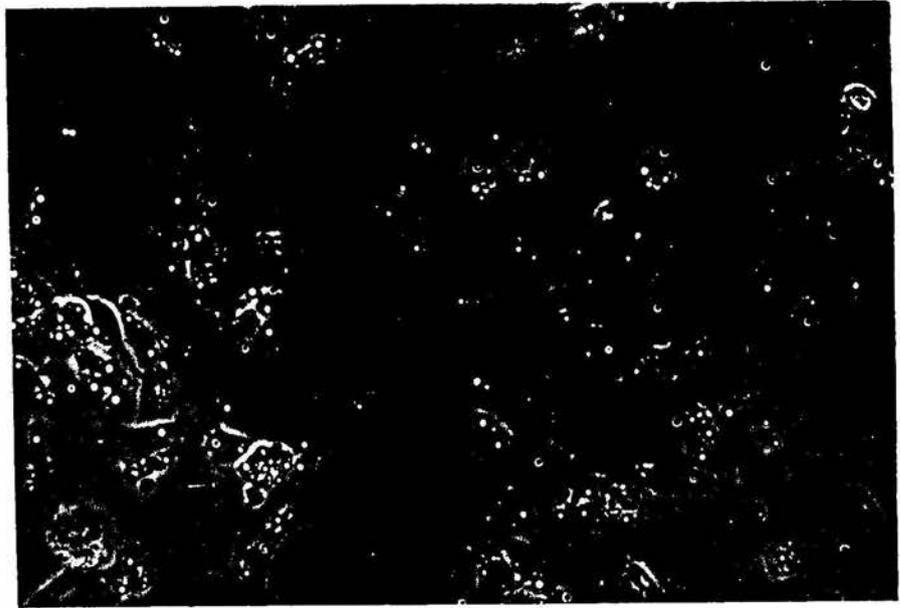
En este sustrato se obtuvieron monocapas homogéneas durante un periodo de 3 días; después de este intervalo de tiempo no se hicieron observaciones de los cultivos.

En la Figura 4 pueden verse las características morfológicas de las células de la granulosa en cultivo; en particular, sobresalen el nucleolo y los gránulos de lípidos en el citoplasma. La presencia de eritrocitos durante las primeras 48 horas es característica de los cultivos de folículos postovulatorios (Figura 4b).

### **Secrecion basal.**

La comparación de los resultados obtenidos en cuanto a la secreción basal de progesterona por miligramo de proteína indican que ésta varía según el estadio del folículo del

A



B

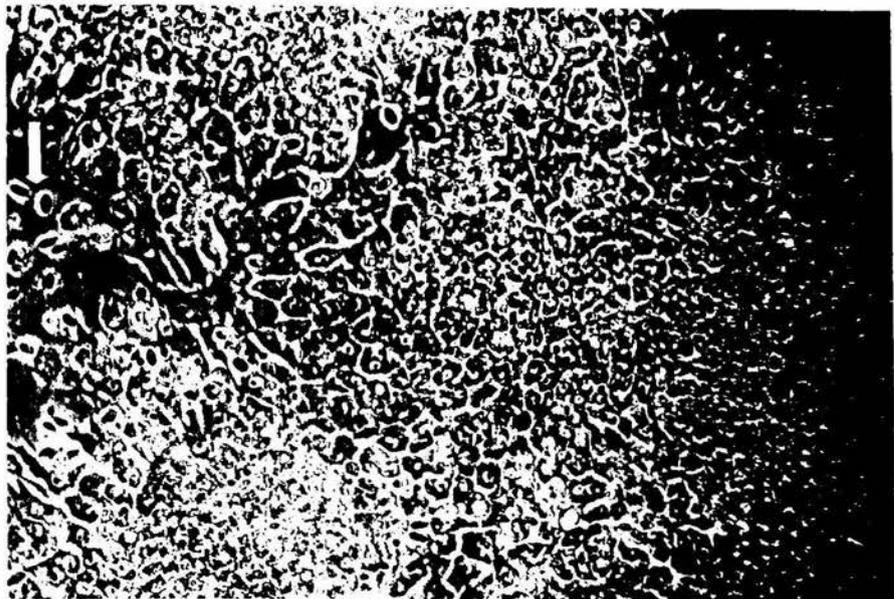


Figura 4. Células de la granulosa de la gallina doméstica a las 48 horas de cultivo. A. Folículo preovulatorio maduro, F1 (200 X). B. Folículo FO, la flecha señala algunos eritrocitos (100 X).

cual se obtuvieron las células (Figuras 5-7, barras sombreadas). Apparently la producción basal de progesterona aumenta a medida que el folículo madura, y decae en los folículos postovulatorios como puede verse en la siguiente tabla:

FOLICULO	PRODUCCION BASAL DE PROGESTERONA (pg/mg de proteína)
Preovulatorio inmaduro	40.6 ± 10.0
Preovulatorio maduro	56.0 ± 7.5
Postovulatorio	17.2 ± 3.9

#### Estimulación con gonadotropinas.

Las células de la granulosa de la gallina, obtenidas de folículos en diferentes estadios de maduración, responden a la estimulación con gonadotropina coriónica humana (GCh). Se observaron diferencias en cuanto a la dosis que evoca la producción máxima de progesterona, como puede verse en las curvas dosis-respuesta de los folículos P0, F5 y F1. (Figuras 5-7).

En la Figura 5 puede verse que las células del folículo preovulatorio maduro tienen una respuesta máxima cuando son estimuladas con 10 mU/ml de GCh. En cambio, para las células de folículos inmaduros (F5) se requieren dosis más elevadas de gonadotropina (50 mU/ml; ver Figura 6) para provocar un aumento significativo en la producción de progesterona.

La dosis óptima para estimular las células de los folículos postovulatorios es 10 veces menor que la requerida por los folículos preovulatorios. La cantidad máxima de progesterona producida por dichas células es aproximadamente igual a la que secretan los folículos preovulatorios, aunque la producción basal es notablemente más baja en el postovulatorio. Cuando se aplicaron dosis de GCh mayores de 10 mU/ml para los folículos F1 y mayores de 1 mU/ml en folículos postovulatorios, se observó una marcada disminución de la respuesta a la hormona.

#### **Cinética.**

En relación a la respuesta temporal, los datos son consistentes con el hecho de que la producción de progesterona estimulada por GCh aumenta en forma considerable a partir de los 60 minutos, llegando a un máximo en 1.5 horas; después de este intervalo de tiempo, tanto la producción basal como la estimulada comienzan a decaer en los folículo estudiados en este trabajo (Figuras 8 y 9). Sin embargo, la caída que se observa en la producción de progesterona es más notable cuando las células están expuestas a la hormona (GCh).

#### **Efectos del suero.**

Las monocapas de los folículos preovulatorios maduros (F1) se desarrollaron igualmente en presencia de suero

bovino fetal o de suero "lavado", al menos en lo que se refiere al aspecto en el microscopio de luz.

Sin embargo, la respuesta esteroidogénica de F1 ante la estimulación con GCh parece depender del suero, aún cuando la producción basal de progesterona no se modificó al variar la concentración de suero en el medio en cultivo. Como se observa en la Figura 10, al disminuir la concentración de suero, disminuye la producción de progesterona dependiente de gonadotropina, inversamente a lo que se ha observado en células de mamífero.

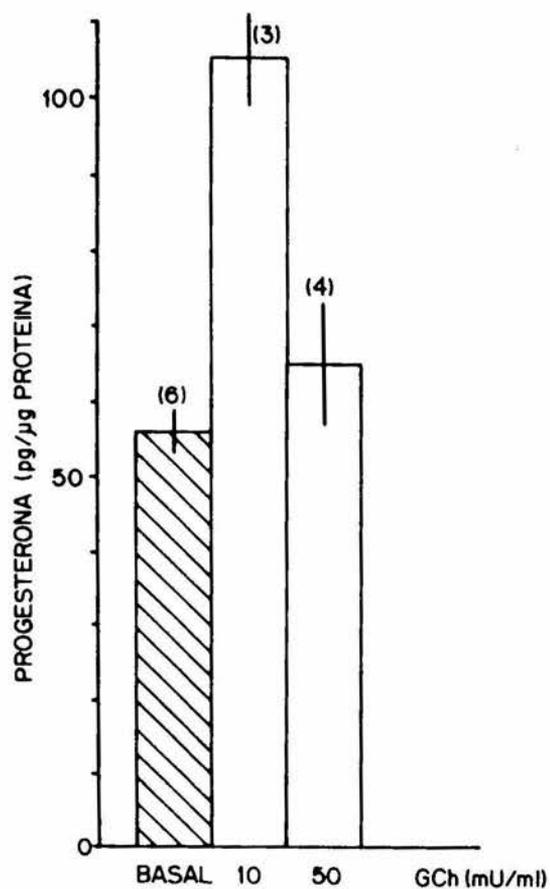


Figura 5. Respuesta a diferentes dosis de GCh de células de la granulosa obtenidas del folículo F1 en cultivo. Las células se cultivaron durante 2 días y se incubaron durante 3 horas con GCh. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  desviación estandar. Entre paréntesis se indica el número de experimentos.

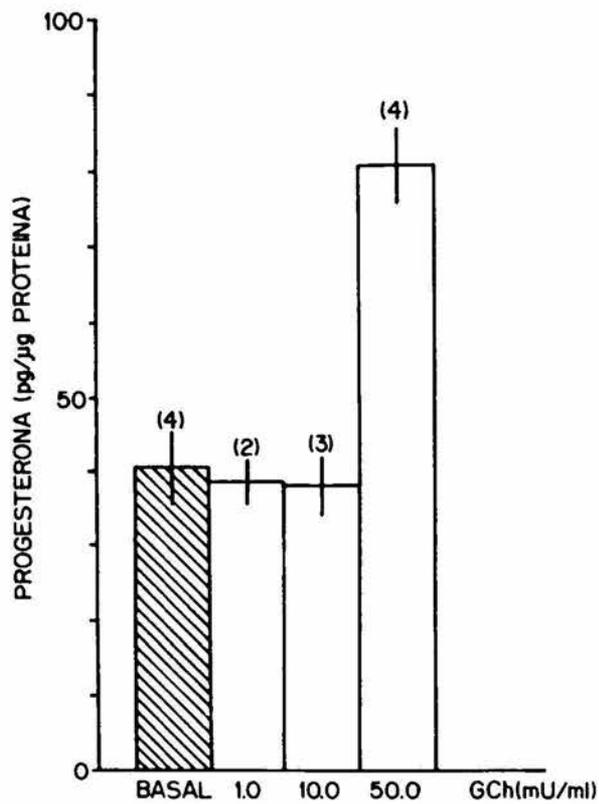


Figura 6. Respuesta a diferentes dosis de GCh de células de la granulosa obtenidas del folículo F5 en cultivo. Las células se cultivaron durante 2 días y se incubaron durante 3 horas con GCh. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  desviación estándar. Entre paréntesis se indica el número de experimentos.

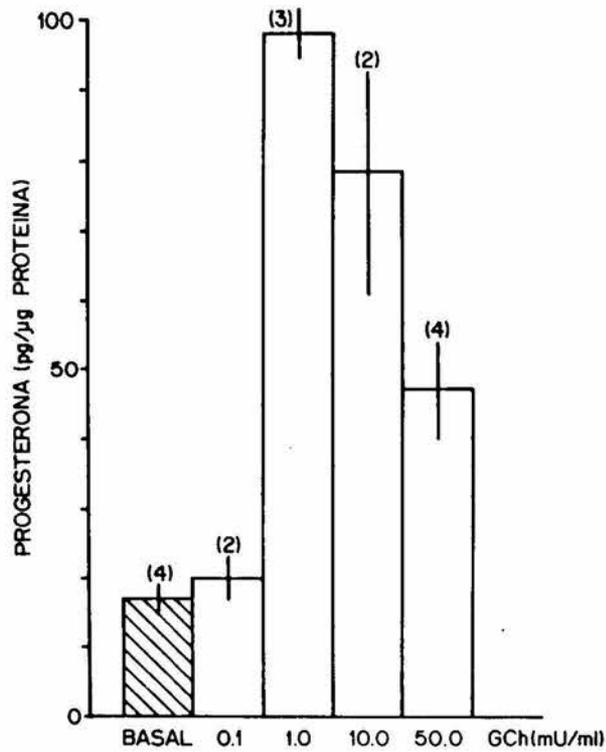


Figura 7. Respuesta a diferentes dosis de GCh de células de la granulosa obtenidas del folículo PO en cultivo. Las células se cultivaron durante 2 días y se incubaron durante 3 horas con GCh. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  desviación estandar. Entre paréntesis se indica el número de experimentos.

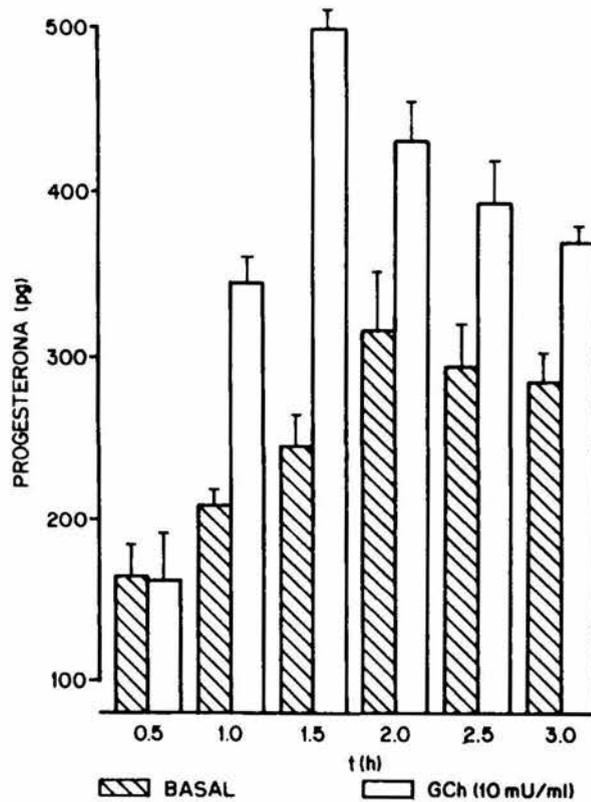


Figura 8. Curso temporal de la producción de progesterona en cultivos de células de la granulosa obtenidas del folículo preovulatorio maduro (F1). Producción basal: barras sombreadas. Producción estimulada con 10 mU/ml de GCh: barras claras. Cada barra representa el promedio de dos experimentos  $\pm$  desviación estándar.

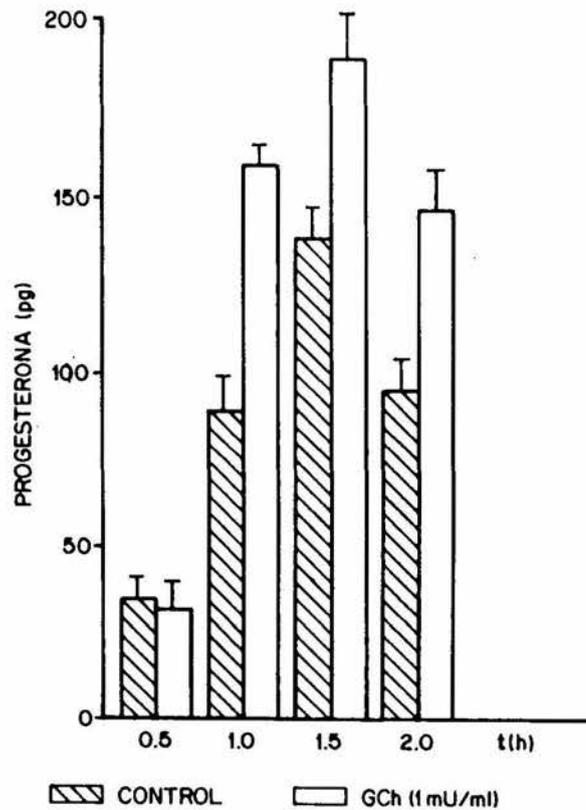


Figura 9. Curso temporal de la producción de progesterona en cultivos de células de la granulosa aisladas del folículo postovulatorio (FO).  
 Producción basal: barras sombreadas.  
 Producción estimulada con 1 mU/ml de GCh: barras claras.  
 Cada barra representa el promedio de dos experimentos  $\pm$  desviación estándar.

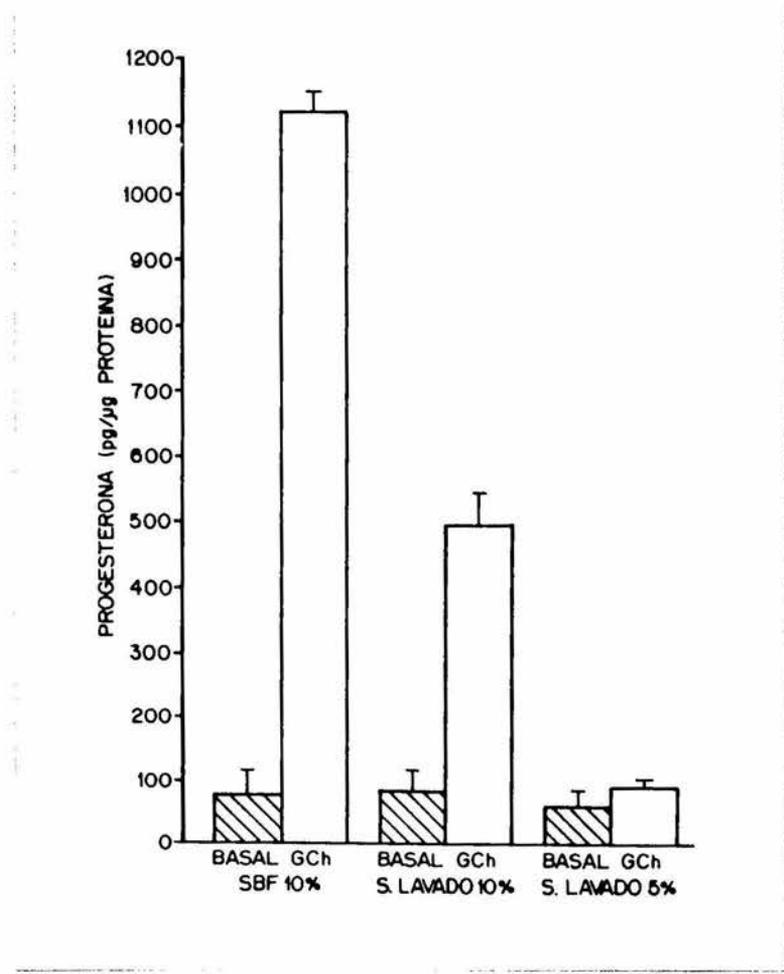


Figura 10. Efecto del suero sobre la producción de progesterona de células de la granulosa del folículo preovulatorio maduro (F1). Producción basal: Barras sombreadas. Producción en presencia de GCh: barras claras. Cada barra representa el promedio de dos experimentos  $\pm$  desviación estándar.

## DISCUSION

El incremento de la secreción basal que se observa a medida que los folículos preovulatorios maduran podría explicarse por la creciente diferenciación de las células de la granulosa, que poseerían una maquinaria esteroidogénica más desarrollada. El hecho de que la producción basal sea menor en los folículos postovulatorios parece indicar que la síntesis de esteroides en esa etapa es más dependiente de gonadotropinas (GCh).

Los resultados obtenidos indican que conforme se desarrollan los folículos preovulatorios, hay un aumento en la sensibilidad de las células cultivadas a gonadotropinas, ya que las células obtenidas de folículos inmaduros requieren dosis más altas de GCh para aumentar significativamente la producción de progesterona.

Este aumento en la sensibilidad a GCh de los folículos preovulatorios podría deberse a un aumento en el número de receptores a LH, como han señalado diversos autores (Richards, 1980) o bien a algún cambio en la especificidad y/o capacidad de unión de los receptores existentes. También debe considerarse el incremento en la capacidad sintética de las células de la granulosa durante la maduración folicular (Armstrong, 1982).

La producción de progesterona en las células del folículo postovulatorio es más dependiente de gonadotropinas que en folículos preovulatorios, ya que se requieren dosis muy pequeñas de BCH para elevar considerablemente la síntesis de esteroides, a partir de una producción basal mínima. Las células fueron aisladas del ovario durante las primeras 3 horas después de la ovulación, lo cual coincide con el máximo de actividad de la adenilato ciclasa observado por Calvo y cols. (1981) en dichas células.

No se hicieron experimentos para evaluar la producción de progesterona en función del tiempo a partir de la ovulación, lo cual hubiese permitido confirmar la disminución en la capacidad sintética del epitelio folicular en periodos mayores a 6 horas. La razón fue que los folículos postovulatorios comienzan a involucionar y se dificulta la obtención del tejido necesario para obtener monocapas homogéneas ya que se desintegra el epitelio y ocurre una invasión de células tecaes y eritrocitos.

Es necesario aclarar que estudios previos sobre la producción de progesterona de folículos postovulatorios *in vitro* indicaban que las células de la granulosa en esta etapa no eran capaces de responder a la estimulación con LH o FSH (Huang y cols, 1979). Sin embargo, en el presente estudio se ha demostrado que este tejido es sensible a

gonadotropinas y que sintetiza cantidades significativas de progesterona.

Esta discrepancia podría explicarse por una contaminación de las suspensiones celulares del epitelio folicular utilizado por Huang y cols. con células tecales, lo cual tendría como consecuencia la utilización de la progesterona producida como precursor para la síntesis de andrógenos y estradiol. Otra posibilidad es que durante el proceso de separación de las células por el método utilizado por dichos autores se perdiesen los receptores a la GCh, ya que estos autores emplearon enzimas para la dispersión celular.

Los resultados obtenidos en las células en cultivo nos permiten concluir que este método proporciona condiciones más favorables para el mantenimiento de las características funcionales de estas células que el método de suspensión celular.

En el presente estudio se observó regulación negativa de la producción de esteroides por la GCh en células del folículo preovulatorio maduro y del postovulatorio, tanto al incrementar la concentración de la hormona como en función del tiempo.

Scanes y Fagioli (1980) observaron, en cambio, que la síntesis de progesterona de folículos preovulatorios aumenta

linealmente con respecto al tiempo. Por otra parte, Calvo y cols. (1981) reportaron ausencia de desensibilización dependiente de la dosis.

Dado que no es posible comparar las condiciones experimentales, esta diferencia en los resultados no puede explicarse a menos que se considere que la fracción de LH de mamífero usada por dichos autores estuviese combinada con FSH (cuya función en las aves es primordialmente vitelogénica), disminuyendo así la proporción real de LH unida a los receptores. La GCh usada en este estudio se une en forma específica a los receptores a LH y los resultados obtenidos son acordes al comportamiento de células diferenciadas, que comúnmente presentan desensibilización en presencia de altas dosis de hormonas o por exposición prolongada a éstas.

En general, la disminución en la respuesta a GCh puede relacionarse con la pérdida de receptores, con una disminución en la actividad de la adenilato ciclasa dependiente de hormonas, o bien al decaimiento en la producción de esteroides a partir de sus precursores (Schumacher, Schwarz y Leidenberg, 1985).

Consideramos poco probable que la etapa de transformación de pregnenolona en progesterona se vea afectada durante la desensibilización, ya que aparentemente

no ocurren cambios en la actividad de la enzima que lleva a cabo este paso. Sin embargo, esta suposición no puede demostrarse a partir de los resultados obtenidos.

En condiciones de cultivo sería relativamente sencillo demostrar si la disponibilidad de precursores es el factor que determina la disminución en la síntesis de progesterona o si existe otro mecanismo asociado con la desensibilización. De esta manera, la disminución en la respuesta hacia GCh que observamos en los cultivos no necesariamente requiere explicarse en relación al número de receptores o por un cambio en el sistema de adenilato ciclasa, sino que podrían deberse al "desgaste" de la reserva intracelular de colesterol.

En relación al efecto del suero sobre la respuesta esteroidogénica nuestros resultados indican diferencias importantes entre las células de la granulosa de mamíferos y de aves.

Para células de mamífero se sabe que el suero facilita el establecimiento de las monocapas y es indispensable para la división celular, favoreciendo el crecimiento de los cultivos; sin embargo, disminuye el potencial esteroidogénico de las células de la granulosa (Orly, Sato y Erickson (1980)).

En el caso del ovario de la gallina, las células de folículos preovulatorios maduros se fijaron al sustrato con la misma facilidad, independientemente de la concentración de suero, y no observamos diferencia en la velocidad de formación de monocapas, por lo que no es posible argumentar en favor de un efecto estimulador del índice mitótico.

Sin embargo, es posible que algún factor del suero sea indispensable para la proliferación de las células de los folículos preovulatorios inmaduros y postovulatorios. Esta posibilidad queda abierta para futuras investigaciones en las que se podría evaluar la proliferación de estas células cultivadas en medios condicionados o con suero lavado.

En cambio, es aparente que al extraer los esteroides del suero y/o disminuir la concentración de suero lavado, la capacidad de responder a la estimulación con gonadotropinas disminuye en las células del folículo F1.

Debido a que la producción basal de progesterona no se modificó en función de la cantidad de suero, resulta evidente que las células disponen de la maquinaria sintética indispensable y que algún factor constituyente del suero participa en forma directa en un proceso que resulta finalmente en la estimulación de la esteroidogénesis en presencia de gonadotropina coriónica.

Este modelo es una herramienta que podría facilitar el conocimiento de los mecanismos hormonales de regulación durante la diferenciación del ovario en aves.

## BIBLIOGRAFIA

- Armstrong D.G., M.F. Davidson, A.B. Gilbert & J.W. Wells 1977, Activity of 3  $\beta$ -hidroxy-steroid dehydrogenase in the postovulatory follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*) J. Reprod. Fertil. 49:253-259.
- Armstrong D.G. 1982, 3  $\beta$ -hidroxy-  $\Delta^5$ -steroid dehydrogenase activity in the rapidly growing ovarian follicles of the domestic fowl (*Gallus domesticus*) J. Endocrinol. 93:415-421.
- Bedolla Tovar N., A. Ulloa-Aguirre, J. Landeros & G. Perez Palacios 1984, Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis I. Guía para la evaluación de resultados. Rev. Invest. Clin. (México) 36: 179-192.
- Bellaire R. 1965, The relationship between oocyte and follicle in the hen's ovary as shown by electron microscopy. J. Embriol. Exp. Morph. 13: 215-233.
- Bonney R.C., F.J. Cunningham & B.J.A. Furr 1974, Effect of synthetic luteinizing hormone releasing hormone on plasma luteinizing hormone in the female domestic fowl *Gallus domesticus*. J. Endocrinol. 63: 539-547.

Boucek R.J. & K. Savard 1970. Steroid formation by the avian ovary in vitro (*Gallus domesticus*). Gen. Comp. Endocrinol. 15: 6-11.

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.

Brambell F.W.R. 1956, Ovarian changes. En: Marshall's Physiology of Reproduction (A.S. Parkes, ed) 3a. ed. Vol 1 Part 1 Longmans Green New York, pag. 397-542.

Calvo F.O., S.-C. Wang & J.M. Bahr 1981, LH-stimulable adenylyl cyclase activity during the ovulatory cycle in granulosa cells of the three largest follicles and the postovulatory follicle of the domestic hen (*Gallus domesticus*). Biol. Reprod. 25: 805-812.

Dahl E. 1971a, The fine structure of the granulosa cells in the domestic fowl and the rat. Z. Zellforsch 119: 58-67.

Dahl E. 1971b. The effects of steroids on the granulosa cells in the domestic fowl. Z. Zellforsch 119: 179-187.

Dick H.R., J. Culbert, J.W. Wells, A.B. Gilbert & M.F. Davidson 1973, Steroid hormones in the postovulatory

follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). J. Reprod. Fertil. 53: 103-107.

Dodd J.M. 1977, Structure of the ovary of nonmammalian vertebrate. En: The Ovary Vol 1: General Aspects, L. Zuckerman & B.J. Weis (eds) Acad. Press New York, pag. 219-263.

Etches R.J. & F.J. Cunningham 1977, The plasma concentrations of testosterone and LH during the ovulation cycle of the hen. Acta Endocrinol. 84: 357-366.

Follet B.K. 1984, Birds. En: Marshall's Physiology of Reproduction Vol 1: Reproductive Cycles of Vertebrates, G.E. Lamming (ed) 4<sup>th</sup> Ed. Churchill Livingstone Inc. New York, pag. 283-350.

Furr B.J.A., Bonney R.C., England R.J. & Cunningham F.J. 1973, Luteinizing hormone and progesterone in peripheral blood during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*). J. Endocrinol. 57: 159-169.

Gilbert A.B. 1971, The ovary. En: Physiology and Biochemistry of the domestic Fowl Vol 3 (D.J. Bell & B.M. Freeman, eds.), Acad. Press, New York pag. 1163-1208

Gilbert A.B., A.J. Evans, M.M. Perry & M.H. Davidson 1977, A method for separating the granulosa cells, the basal lamina and the theca of preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). J. Reprod. Fertil. 50: 179-181.

Gilbert A.B., M.F. Davidson & J.W. Wells 1978, Role of the granulosa cells of the postovulatory follicle of the domestic fowl in oviposition. J. Reprod. Fertil. 52: 227-229.

Hammond R.W., H. Todd & F. Hertelendy 1980, Effects of mammalian gonadotropins on progesterone release and cyclic nucleotide production by isolated avian granulosa cells. Gen. Comp. Endocrinol. 41:467-476.

Hodges R.D. 1974, The Histology of the fowl, Acad. Press. New York, 648 pp.

Huang E. S-R & A.V. Nalbandov 1979a, Steroidogenesis of chicken granulosa and theca cells: in vitro incubation system. Biol. Reprod. 20: 442-453.

Huang E. S-R & A.V. Nalbandov 1979b, Synthesis of sex steroids by cellular components of chicken follicles, Biol. Reprod. 20: 454-461.

Imai K. & A. V. Nalbandov 1978, Plasma and follicular steroid levels of laying hens after the administration of gonadotropins. Biol. Reprod. 19: 779-784.

Jacoby W.B. & F.W. Fastan 1979, Methods in Enzymology Vol.LVIII: Cell Culture, Acad. Press. USA, Pag 121,142.

Kohsaka T. & K. Ishida 1980, Ultrastructure of the granulosa cells in the new ovarian follicles before and after ovulation. Jpn. J. Zootech. Sci. 51(10): 696-700.

Lance V. & Callard L.P. 1978, Steroidogenesis by enzyme-dispersed turtle (*Chrysemis picta*) ovarian cells in response to ovine gonadotropins (FSH). Gen.Comp. Endocrinol. 34: 304-311.

Licht P. & Crews D. 1976, Gonadotropin stimulation of *in vitro* progesterone production in reptilian and amphibian ovaries. Gen. Comp. Endocrinol. 29: 141-151.

Llewelin C.A. 1981, Conversion of [<sup>14</sup>C] progesterone to androstenedione *in vitro* by thecal tissue from the ovary of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). J. Endocrinol. 89: 283-288.

Marrone B.L. & F. Hertelendy 1983a, Steroidogenesis by avian ovarian cells: effects of the luteinizing hormone and

substrate availability. Am. J. Physiol. 244 (Endocrinol. Metab. 7): E487-E493.

Marrone B.L. & F. Hertelendy 1983b, Steroid metabolism by avian ovarian cells during follicular maturation, Biol. Reprod. 29: 953-962.

Mori M., K. Kohomoto & T. Shode 1985, Effects of cyclic AMP and protein synthesis inhibitors on *in vitro* progesterone synthesis by the granulosa cells of the quail (*Coturnix coturnix japonicus*). Comp. Biochem. Physiol. 81B (2): 473-477.

Narbatz R. & E.M. de Robertis 1968, Postnatal evolution of the steroidogenic cells in the chick ovary. Histochem. 15: 187-193.

Opel H. & A.V. Nalbandov, 1961a, Follicular growth and ovulation in hypophysectomized hens. Endocrinol. 69: 1016.

Opel H. & A.V. Nalbandov, 1961b, Ovulability of the ovarian follicles in the hypophysectomized hen, Endocrinol. 69: 1029.

Orly J., G. Sato & G.F. Erickson 1980, Serum suppresses the expression of hormonally induced functions in cultured granulosa cells, Cell 20: 817-827.

Press, N. 1964, An unusual organelle in avian ovaries, J. Ultrastructure Res. 10: 528-546.

Ralph C.L. & R.M. Fraps 1960, Induction of ovulation in the hen by injection of progesterone in the brain, Endocrinol. 66: 269.

Richards, J.S. 1980, Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell development. Physiol. Rev. 60: 51-89.

Scanes C.G., P.M.M. Godden & P.J. Sharp, 1977, An homologous radioimmunoassay for chicken follicle stimulating hormone: observations on the ovulatory cycle. J. Endocrinol. 73: 473-481.

Scanes C.G. & J.H. Fagioli 1980, Effects of mammalian and avian gonadotropins on *in vitro* progesterone production by avian ovarian granulosa cells. Gamete Res. 11: 191-221.

Schroeder P.C. & P. Talbot 1985, Ovulation in the animal kingdom: A review with an emphasis on the role of contractile processes. Gamete Res. 11: 191-221.

Schumacher M., M. Schwarz & F. Leindenberg, 1985, Desensitization of mouse Leydig cells *in vivo*: evidence for

the depletion of cellular cholesterol. Biol. Reprod. 33: 335-345.

Shahabi N.A., H.W. Norton & A.V. Nalbandov 1975, Steroid levels in follicles and the plasma of the hens during the ovulatory cycle. Endocrinol. 96(4): 962-968.

Shahabi N.A., J.M. Bahr & A.V. Nalbandov 1975, Effect of LH injection on plasma and follicular steroids in the chicken, Endocrinol. 96(4): 969-972.

Sharp P.J. 1981, Female Reproduction. En : Avian Endocrinology, A. Epple & M.H. Stetson (eds), Acad. Press. New York, pag. 435-454.

Soliman K. & C. Walker, 1976, In vitro motility of the avian ovarian follicles. Gen. Comp. Endocrinol. 30:372-378.

Sturkie P.D. 1976, Reproduction in the female and egg production. En: Avian Physiology, Springer-Verlag, New York, pag. 302-330.

Tanabe Y. & T. Nakamura 1980, Endocrine mechanism of ovulation in chickens (*Gallus domesticus*), quail (*Coturnix coturnix japonica*) and ducks (*Anas platyrhynchos domestica*). En: Biological Rhythms in Birds: Neural and Endocrine

Aspects, Y. Tanabe y cols (eds) Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, Springer Verlag pag. 179-188.

Tanaka K. & M. Kamiyoshu 1980, Rhythms of steroid hormone secretion in the domestic fowl. En: Biological Rhythms in Birds: Neural and Endocrine Aspects. Y. Tanabe y cols (eds) Japan Sci. Soc Press, Tokyo, Springer Verlag pag. 169-177.

Wells J.W., A.B. Gilbert & J. Culbert 1980, Effect of luteinizing hormone on progesterone secretion *in vitro* by the granulosa cells of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). J. Endocrinol. 84: 249-254.

Williams J.B. & P.J. Sharp 1978, Control of the preovulatory surge in the chicken: the role of the progesterone and androgens. J. Endocrinol. 77:57-65.

Wilson & Sharp 1973, Variations in the plasma LH levels during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*). J. Reprod. Fertil. 35: 561-564.

Wilson S.C. & P.J. Sharp 1975, Changes in plasma concentration of luteinizing hormone after injection of progesterone at various times during the ovulatory cycle in the hen. J. Endocrinol. 67: 59-70.

Wyburn G.M., R.N.C. Aitken & H.S. Johnston 1965, The ultrastructure of the zone radiata of the ovarian follicle of the domestic fowl. *J. Anat.* 99(3): 469-484.

Wyburn G.M., H.S. Johnston & R.N.C. Aitken 1966, Fate of the granulosa cells in the hen's follicle. *Z. Zellforsch* 72: 53-65.

## INDICE

	PAG.
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	25
OBJETIVOS	26
METODOS	27
RESULTADOS	34
DISCUSION	45
BIBLIOGRAFIA	52