

11281  
1281

# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**División de Estudios de Posgrado e Investigación.  
Facultad de Medicina.**

**PARTICIPACION DE DIFERENTES POBLACIONES  
CELULARES EN LA ESTEROIDOGENESIS OVARICA  
EN ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO.**

## **T E S I S:**

**Que presenta el M. en C.:**

**MARCO ANTONIO JUAREZ OROPEZA**

**Para obtener el grado de:**

**Doctor en Ciencias Biomédicas  
(Bioquímica)**



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 está 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.

**PARTICIPACION DE DIFERENTES POBLACIONES CELULARES EN LA  
ESTEROIDOGENESIS OVARICA EN ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO.**

**INDICE**

	página
1.- RESUMEN .....	1
2.- PROLOGO .....	1
3.- INTRODUCCION .....	3
Los esteroides ováricos. ....	5
Panorama de las vías esteroidogénicas en el ovario adulto. ....	9
Células esteroidogénicas, orígenes y funciones. ....	18
Esteroidogénesis por el ovario en desarrollo. ....	22
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	27
5.- OBJETIVOS .....	28
6.- TRABAJO EXPERIMENTAL .....	31
7.- DISCUSION Y CONCLUSIONES .....	43
8.- PERSPECTIVAS .....	54
9.- REFERENCIAS GENERALES .....	58
10. APENDICES .....	63
10.1 Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. Gen. Comp. Endocrinol. 71: 153-162, 1988.	
10.2 Regional distribution of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydro- genase, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase, and aromatase activities in the bovine early fetal ovary. J. Steroid Biochem. submitted for publication, 1990.	

## RESUMEN

Se estudiaron las características esteroidogénicas de las poblaciones celulares del ovario prefollicular en distintas etapas de desarrollo (recién nacido y fetal), tomando como modelos al pollo y al bovino, respectivamente. En el modelo del pollo recién nacido, se disgregaron las células del ovario funcional (izquierdo) mediante exposición a la tripsina durante varios tiempos. La suspensión celular obtenida a los 30 minutos fue la que presentó mayor actividad esteroidogénica, evaluada por la secreción basal de testosterona y  $17\beta$ -estradiol mediante radioinmunoanálisis (RIA). Esta suspensión celular fue sometida a un gradiente de densidad con metrizamida (0-30%), resultando cinco fracciones celulares, denominadas II-VI. Mediante este procedimiento fue posible la identificación de dos poblaciones celulares, responsables de la producción de andrógenos y estrógenos. Todas las poblaciones aisladas respondieron, aunque de manera diferente, al estímulo por hCG, indicando la presencia de receptores funcionales para esta gonadotropina.

En el modelo fetal de bovino, se estudió la capacidad esteroidogénica de la corteza y médula ováricas. Para lograr lo anterior, se separaron la corteza de la médula y posteriormente se disgregaron las células correspondientes a cada región, mediante la exposición durante 15 minutos a la tripsina. Subsecuentemente, las suspensiones celulares obtenidas por este procedimiento fueron estudiadas en su capacidad para metabolizar precursores esteroides radioactivos: testosterona, androstenediona, dehidroepiandrosterona y pregnenolona. Los metabolitos radiactivos nos indicaron la actividad de las enzimas involucradas, que por el diseño del presente estudio correspondieron a la  $3\beta$ -HSD,  $17\beta$ -HSD y aromatasa. Para cada región ovárica, la actividad enzimática fue corregida por el número de células y expresada en función de la edad gestacional (o longitud C-R). Adicionalmente, se investigó la localización ovárica de la actividad de la  $3\beta$ -HSD, mediante reacción histoquímica utilizando como precursor a la dehidroepiandrosterona. Los resultados mostraron que la actividad de aromatasa estuvo presente en ambas regiones, observándose un ligero predominio en la médula. Por otra parte, las actividades de la  $17\beta$ -HSD y  $3\beta$ -HSD mostraron un claro predominio en la región medular, indicando que la distribución de las enzimas estudiadas no fue homogénea. La reacción histoquímica para la  $3\beta$ -HSD fue localizada en la médula yuxtacortical, confirmando los resultados obtenidos con precursores marcados.

Los resultados obtenidos en ambas especies indican la existencia en el ovario prefollicular de poblaciones celulares con capacidades esteroidogénicas diferentes, y proporcionan las primeras evidencias de que la cooperación celular en la esteroidogénesis es observable desde etapas tempranas del desarrollo.

## PROLOGO

El interés en conocer la relación entre la estructura y la función de las gónadas fetales ha conducido a un mejor entendimiento de la Fisiología y Patología de estos tejidos. No obstante, la síntesis de esteroides por el ovario fetal ha recibido poca atención, debido a que se consideraba que este tejido era inactivo durante las primeras etapas del desarrollo, por lo que su extirpación no resultaba importante para la apariencia fenotípica femenina.

Aunque estudios recientes han demostrado en varias especies que el ovario fetal es capaz de producir estrógenos desde el momento de la diferenciación morfológica de la gónada, el papel fisiológico de estos esteroides aún no ha sido aclarado.

De las especies en las que se ha demostrado la síntesis de estrógenos por el ovario en desarrollo, llaman la atención el pollo recién nacido y el feto de bovino, debido a que en el primero existe una actividad esteroidogénica intensa y relativamente constante, mientras que en el segundo, la secreción del  $17\beta$ -estradiol ocurre transitoriamente durante el periodo de diferenciación morfológica, acompañada ésta, del crecimiento de la corteza y la involución relativa de la médula ovárica.

Por otro lado, aunque se ha observado que en la esteroidogénesis por el ovario adulto ocurre la cooperación

celular, no existen trabajos en preparaciones de ovario prefolicular que muestren esa cooperación.

Por tal motivo, en el presente trabajo se estudió la síntesis de los esteroides por las células ováricas del pollo recién nacido y del feto bovino, demostrándose la participación de diferentes tipos celulares en el proceso esteroidogénico, lo cual representa la primera evidencia de cooperación celular por el ovario en desarrollo.

## INTRODUCCION

El ovario, al igual que el testículo, desempeña dos funciones principales, esenciales para la reproducción y supervivencia de las especies: la formación y maduración de las células germinales (gametogénesis) y la producción de hormonas sexuales (esteroidogénesis). En la etapa reproductiva, las hormonas secretadas por las gónadas inducen y mantienen la aparición de las características sexuales secundarias, típicas de la edad adulta, así como la aparición del ciclo ovárico en la hembra. Las principales unidades funcionales del ovario son los folículos. Cada uno de éstos proporciona el sistema de apoyo para que la célula germinal femenina (el ovocito) alcance su máximo potencial, la cual al unirse con una célula germinal masculina (el espermatozoide), genera un embrión capaz de desarrollarse completamente, conduciendo al nacimiento de un producto normal (1).

Las células somáticas del folículo, le proporcionan al ovocito las sustancias nutritivas, necesarias para su crecimiento. Las células foliculares pueden actuar sobre el desarrollo y el destino de los ovocitos, mediante modificaciones del microambiente interno del folículo. Además, algunas células especializadas de la granulosa (células del cumulus ooforus), están acopladas metabólicamente entre ellas y la célula germinal, a través de uniones intercelulares comunicantes, mediante las cuales,

las sustancias nutritivas y las moléculas reguladoras son liberadas directamente en el ovoplasma (2,3).

De los productos secretados por el folículo, los mejor conocidos y caracterizados son las hormonas esteroides. Los esteroides foliculares realizan un gran número de funciones importantes, relacionadas con la reproducción. Estas sustancias funcionan como hormonas en el sentido "clásico", es decir, son transportadas por la circulación a una gran variedad de tejidos blancos, que comprenden no sólo al sistema reproductor, sino también otros órganos y sistemas, incluyendo al sistema nervioso central, al sistema musculoesquelético, al sistema cardiovascular, al sistema inmune, al hígado y a los tejidos adiposo y cutáneo.

Los efectos de los esteroides sobre el proceso reproductor suelen ejercerse a muy diferentes niveles. Por ejemplo, en el cerebro controlan que el comportamiento sexual asegure el que las hembras sean capaces de aparearse en el momento de la ovulación. Las acciones en el músculo y los cilios del oviducto permiten que el complejo cupulus-ovocito sea tomado por la fimbria ductal y permanezca en el sitio de la fertilización, mientras que, al mismo tiempo, ayudan en el transporte del espermatozoide a ese sitio.

Los esteroides inducen, también, los cambios endometriales asociados con la implantación del embrión en desarrollo, manteniendo el embarazo una vez que se ha establecido y, al final de éste, participan en la liberación del producto a término.



Además de actuar como hormonas en estructuras lejanas al ovario, los esteroides ováricos también actúan localmente dentro de los folículos que las producen, tanto como moduladores parácrinos de las células adyacentes, como agentes autócrinos en las células que las producen.

Los esteroides formados por las células de la granulosa pueden afectar el patrón secretorio de las células tecales y la maduración meiótica del ovocito. También actúan en las mismas células de la granulosa, modulando tanto su velocidad mitótica, como su diferenciación.

## LOS ESTEROIDES OVARICOS

### Clasificación Química y Biológica.

Las hormonas esteroides pueden ser clasificadas con base en su estructura química o en sus acciones fisiológicas. El sistema de clasificación química relaciona a los esteroides con uno de los varios patrones, o compuestos precursores: el colestano ( $C_{27}$ ), el pregnano ( $C_{21}$ ), el androstano ( $C_{19}$ ) y el estrano ( $C_{18}$ ). Todos estos, derivan de un anillo de ciclopentano perhidrofenantreno (o más simplemente, núcleo esteroide). Los componentes adicionales, varían con base en la clase de esteroide (Fig. 1).

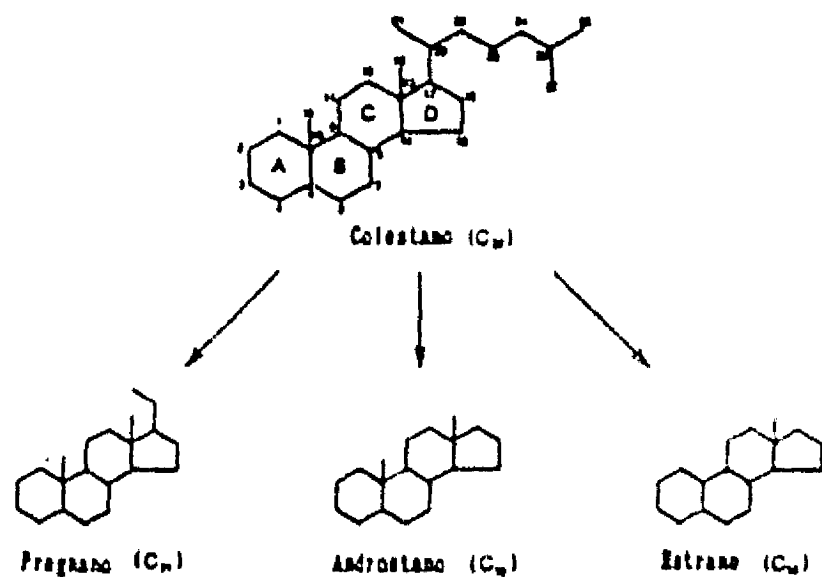


Figura 1. Clasificación química de los esteroides ováricos, tomando como referencia a las estructuras patrón o precursoras de la cual derivan. Como se puede observar, todas las estructuras esteroideas se derivan del colestano. El subíndice indica el número de carbonos de cada esqueleto esteroideo (Modificada de la referencia 24).

Los esteroides ováricos también se clasifican con base en su función biológica principal: progestinas, andrógenos y estrógenos. Los tres tipos de esteroides descritos son producidos por los folículos ováricos en uno o más estadios de desarrollo.

#### Progestinas.

Como precursor de todas las hormonas esteroides, la pregnenolona (3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona) es la progestina más abundante que produce el folículo. La progesterona (4-pregnen-3,20-diona) es el metabolito C<sub>21</sub> más abundante, producido como intermediario biosintético por el folículo en todos los estadios de crecimiento y desarrollo y como un producto final de secreción, en los periodos peri- y postovulatorios. Otros esteroides C<sub>21</sub> de origen folicular incluyen la 17 $\alpha$ -hidroxiprogesteron, 20 $\alpha$ -dihidroprogesterona (20 $\alpha$ -DHP) y su epímero 20 $\beta$ , así como los 17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ - y 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -pregnandiolos. Además, se ha observado que los metabolitos reducidos en el anillo 'A' de cada uno de estos compuestos pregn-4-en, pueden ser sintetizados por los tejidos ováricos de varias especies (particularmente en roedores y aves) bajo ciertas condiciones fisiológicas (4,5).

## Andrógenos.

Con base en su concentración, los principales andrógenos ováricos, producidos generalmente como intermediarios en la síntesis de estrógenos, son la dehidroepiandrosterona, la androstenediona y la testosterona. También han sido identificados algunos esteroides C<sub>19</sub>, no aromatizables, formados por la saturación del anillo 'A' del núcleo esteroide. Los andrógenos ováricos 5 $\alpha$ -reducidos que han sido observados en varias especies incluyen la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT, 17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-3-ona), 5 $\alpha$ -androstan-3,17-diona, androsterona y epiandrosterona, así como el 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, y su epímero 3 $\beta$ . También se ha reportado la producción ovárica de andrógenos 5 $\beta$ -reducidos en el hamster.

## Estrógenos.

Fisiológicamente, los principales estrógenos foliculares son la estrona y el 17 $\beta$ -estradiol. Los nombres triviales reflejan su papel en la inducción de la receptividad sexual (estro) en las hembras de mamíferos, pero también tienen otras funciones en la fisiología de la reproducción femenina. En 1929, Doisy y cols. (6) cristalizaron la estrona (3-hidroxi-1,3,5(10)-estratrien-17-ona) a partir de orina de mujeres embarazadas, siendo este

el primer esteroide sexual aislado e identificado. El  $17\beta$ -estradiol [1,3,5(10)-estratrien-3,17 $\beta$ -diol] es aproximadamente 10 veces más potente que la estrona en la mayoría de los ensayos biológicos, y en base molar, es el más activo de todos los esteroides producidos por el ovario. Varios derivados hidroxilados de estos esteroides  $C_{18}$ , han sido identificados recientemente en el folículo, incluyendo a la 2-hidroxiestrona (2,3-dihidroxi-1,3,5(10)-estratrien-17-ona), 2-hidroxiestradiol y sus derivados 2-metilados, así como los derivados 4-hidroxi, 6-hidroxi y 16-hidroxi, tanto del estradiol como de la estrona (7).

Además de los esteroides  $C_{18}$  aromáticos, otros compuestos de la serie estrano, 19-norandrostenediona (4-estren-3,17-diona) y 19-nortestosterona (17 $\beta$ -hidroxi-4-estren-3-ona) han sido identificados en el líquido folicular de la yegua y de la cerda (8,9). No se conoce la función fisiológica de estos esteroides  $C_{18}$  no aromáticos.

#### PANORAMA DE LAS VIAS ESTEROIDOGENICAS EN EL OVARIO ADULTO.

Como el colesterol es el precursor inicial en la síntesis de hormonas esteroides, las células ováricas lo obtienen a partir de cualquiera de las tres posibles fuentes: (a) del colesterol preformado, transportado por la sangre en la forma de lipoproteínas circulantes; (b) del colesterol preformado, almacenado en la célula ovárica como

colesterol libre (constituyente de las membranas celulares), o liberado de los ésteres de colesterol almacenados en las gotas lipídicas citoplásmicas; y (c) el colesterol sintetizado de novo en la célula ovárica a partir de componentes de dos carbonos, derivados del metabolismo de los carbohidratos, lípidos o proteínas.

El grado de participación en la esteroidogénesis ovárica, de cada una de las fuentes del colesterol, varía con la especie animal y con el tipo de célula involucrada.

De las lipoproteínas plasmáticas (10-12), las que parecen ser la fuente más importante del colesterol esteroidogénico son las LDL y las HDL. Estas lipoproteínas pueden interactuar con sus receptores específicos, localizados sobre la superficie de las células de la teca, de las células intersticiales, de las células de la granulosa luteinizadas y en las células del cuerpo lúteo. Una vez que la lipoproteína ha sido reconocida por su receptor específico, el colesterol ingresa a las células a través del procedimiento llamado endocitosis mediada por receptor (13-16).

Se han observado diferencias de especie en relación a la importancia relativa de las dos clases de lipoproteínas. En los roedores, por ejemplo, las HDL parecen ser las de mayor importancia cuantitativa, mientras que en otras especies, incluyendo al humano, el colesterol asociado a las LDL es la fuente principal del colesterol esteroidogénico (17,18).

El cuerpo lúteo y la teca interna del folículo tienen un riego sanguíneo abundante y un endotelio capilar altamente permeable, lo que permite que las lipoproteínas puedan interactuar in vivo con su receptor. Por otro lado, las células de la granulosa están aisladas del contacto directo con la sangre, ya que una membrana basal relativamente impermeable, impide el paso de las LDL. Solamente después de que la luteinización ha sido iniciada por la secreción preovulatoria de la hormona luteinizante, la membrana basal es penetrada por una red capilar, permitiendo así un acceso más rápido de las lipoproteínas a las células de la granulosa luteinizadas.

Las células ováricas que están en una posición adecuada para tomar el colesterol extracelular de las lipoproteínas circulantes, almacenan cantidades sustanciales de colesterol en las gotas lipídicas intracelulares, principalmente como ésteres de colesterol con ácidos grasos de cadena larga. El balance entre la proporción de colesterol libre y esterificado se debe a la actividad de las enzimas Acil-CoA: colesterol-O-aciltransferasa (ACAT) y la colesterol éster hidrolasa (colesterol esterasa). La actividad de ambas enzimas, así como la de la enzima limitante de la velocidad de la síntesis del colesterol, la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa), son reguladas hormonalmente, así como por los niveles intracelulares de colesterol (19-21).

### Ruptura de la cadena lateral del colesterol.

El primer paso en la esteroidogénesis, y el paso que generalmente se acepta como el limitante de la velocidad de la síntesis de esteroides bajo la mayor parte de las condiciones experimentales, es la ruptura del enlace covalente entre las posiciones C20 y C22 del colesterol, resultando en un compuesto de 21 átomos de carbono llamado pregnenolona, y en un fragmento de 6 carbonos, el aldehído isocaproico. El sistema enzimático que cataliza esta reacción está localizado en la cara interna de la membrana interna mitocondrial. Es un complejo multienzimático que consta de tres componentes: el citocromo P-450<sub>sc</sub> (side-chain cleavage), que es la oxigenasa terminal (aceptora de electrones), una flavoproteína, y la ferrosulfoproteína "luteodoxina" o "adrenodoxina", que sirve para acortar un electrón entre los otros dos componentes. La reacción utiliza NADPH, oxígeno y colesterol en una relación molar 3:3:1, respectivamente.

La vía generalmente aceptada para la biosíntesis de la pregnenolona, a partir de colesterol, es la descrita en la figura 2, aunque se cree que los intermediarios permanecen unidos al complejo enzimático.



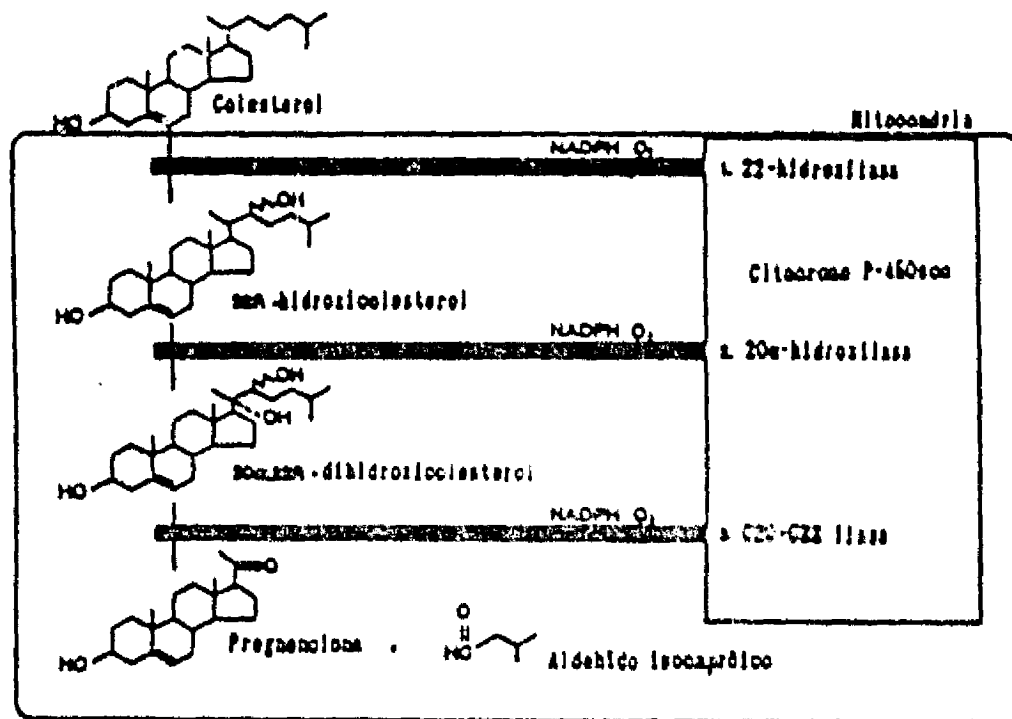


Figura 2. Via de síntesis de la pregnenolona. Se representan los intermediarios en la biosíntesis de pregnenolona, indicando los sitios en los que se consumen el NADPH y el oxígeno molecular. El sistema enzimático responsable de la ruptura de la cadena lateral del colesterol es el citocromo P-450c11 (side-chain cleavage), el cual presenta tres actividades enzimáticas, que han sido descritas como 22-hidroxilasa, 20 $\alpha$ -hidroxilasa y C20-C22 liasa. Los intermediarios probablemente se encuentran unidos al sistema enzimático (Modificado de la referencia 24).

**3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/delta 5-4 isomerasa (3 $\beta$ -HSD).**

La pregnenolona es el precursor común a todas las clases de esteroides producidos por cualquier tejido esteroideogénico. Este metabolito es convertido en progesterona mediante una reacción catalizada por la 3 $\beta$ -HSD, un complejo enzimático cuya actividad se localiza en los microsomas.

Aunque la separación de las actividades de deshidrogenasa e isomerasa ha sido lograda en el sistema enzimático bacteriano, en los tejidos esteroideogénicos de mamíferos, incluyendo al ovario, no se han podido separar y parecen funcionar fisiológicamente como una sola entidad. La enzima utiliza NAD<sup>+</sup> como coenzima, y la reacción es esencialmente irreversible bajo condiciones fisiológicas. De manera similar, pero quizá por diferentes enzimas, se realiza la transformación de 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona y dehidroepiandrosterona en 17 $\alpha$ -hidroxiprogestero y androstenediona, respectivamente.

**Ruptura de la cadena lateral de los esteroides C<sub>19</sub>.**

El paso limitante de la velocidad de síntesis de andrógenos es la reacción catalizada por el complejo enzimático 17 $\alpha$ -hidroxilasa/ C17-C20 liasa, un componente de

las membranas del retículo endoplásmico liso. Este sistema enzimático es una oxidasa de función mixta que contiene citocromo P-450, requiere NADPH y oxígeno molecular. Como sucede con el sistema de ruptura de la cadena lateral del colesterol, es probable que el intermediario 17 $\alpha$ -hidroxi permanezca unido al complejo enzimático. Si la pregnenolona es utilizada como sustrato, el producto resultante será la dehidroepiandrosterona, mientras que si el sustrato es progesterona el producto será la androstenediona. Estas dos vías alternativas han sido conocidas como 5-en-3 $\beta$ -hidroxi (o delta 5) y 4-en-3-oxo (o delta 4).

#### Aromatización de los esteroides C<sub>19</sub>.

La androstenediona y la testosterona son convertidas en estrona y 17 $\beta$ -estradiol, respectivamente, mediante la actividad de la aromatasa, un complejo enzimático localizado en las membranas del retículo endoplásmico liso de varios tipos celulares ováricos. Este complejo enzimático es un citocromo P-450 que cataliza un grupo de reacciones que conducen a la remoción del grupo metilo angular en la posición C10, seguido por el rearrreglo del anillo 'A' a la estructura aromática. En la remoción, que requiere NADPH, se consumen 3 moles de O<sub>2</sub> (Fig.3).

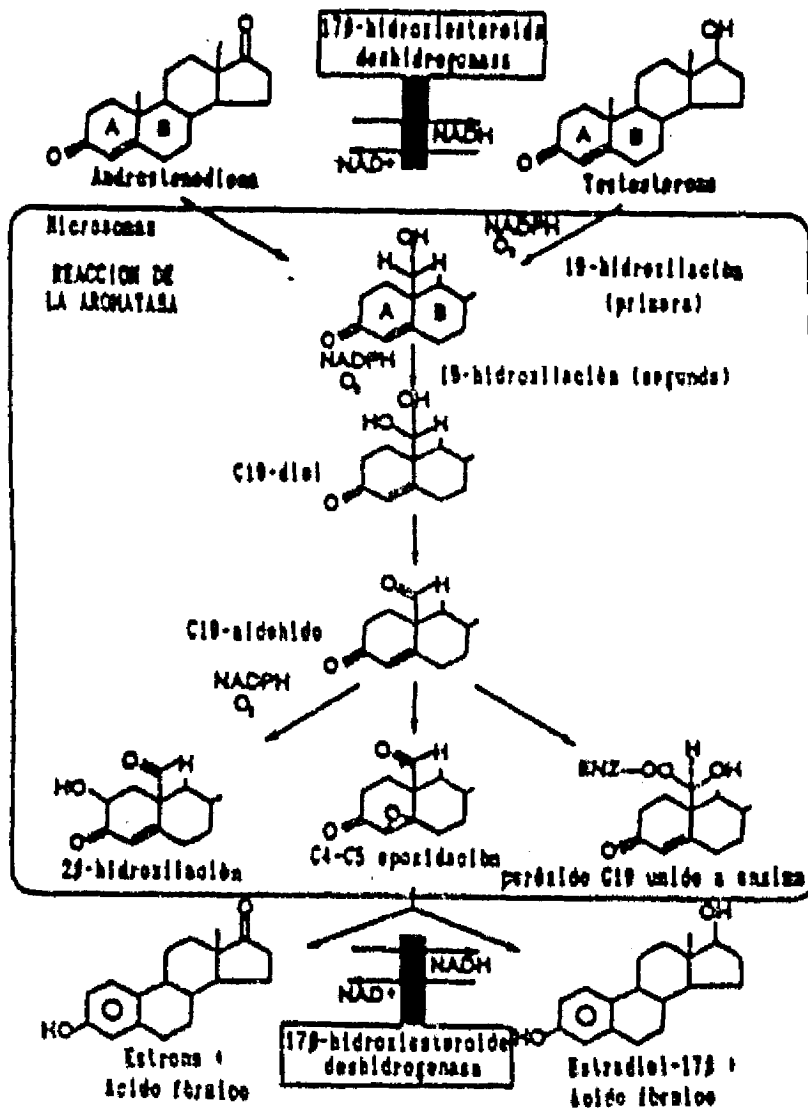


Figura 3. Secuencia de reacciones en la aromatización de la androstenediona y testosterona. El sistema enzimático de la aromatasa cataliza un grupo de reacciones en las cuales los intermediarios permanecen unidos a la enzima. Las reacciones involucran el consumo de 3 moles de oxígeno. Se sabe que los dos primeros participan en las dos hidroxilaciones del C19, mientras que para el consumo del último se han propuesto tres mecanismos alternos. La hidroxilación en la posición C2β es la que se considera más probable. El paso final, que resulta en la remoción de la posición C19 y la aromatización del anillo 'A' parecen ocurrir por un mecanismo no enzimático. Finalmente, se representa la actividad de la 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (Modificado de la referencia 24).

### 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ -HSD).

Los esteroides 17-hidroxi y 17-oxo pueden ser rápida y reversiblemente interconvertidos mediante la actividad de la 17 $\beta$ -HSD, presente en los microsomas de diversos tejidos esteroidogénicos, incluyendo al folículo. Debido a que los estrógenos, al igual que los andrógenos, pueden ser sustratos de esta reacción, se ha propuesto que la enzima tenga amplia especificidad por sustrato, o bien, que existan isoenzimas (22).

### 20 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (20 $\alpha$ -HSD).

El grupo carbonilo C20 de los esteroides C<sub>21</sub>, incluyendo a la progesterona, 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona y progestinas saturadas en el anillo 'A', puede ser reducido enzimáticamente, dando lugar a sus correspondientes 20-hidroxiderivados. La enzima que cataliza esta reacción, la 20-hidroxiesteroide deshidrogenasa, cuando se ha estudiado en las células ováricas (cuerpo lúteo, folículos y células intersticiales) de diversas especies, muestra una estereoespecificidad para la configuración 20 $\alpha$ , aunque la derivada del cuerpo lúteo de bovino, produce excepcionalmente al metabolito 20 $\beta$ -hidroxi. Las 20-hidroxiesteroide deshidrogenasas son enzimas citosólicas, que utilizan preferencialmente al NADPH como coenzima reductora.

De manera análoga a como sucede en la placenta humana, se ha postulado que la actividad de la 20 $\alpha$ -HSD ovárica proporciona un medio de controlar la potencia biológica de los esteroides C<sub>21</sub> secretados por este tejido, ya que el derivado 20 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3-ona es considerablemente menos activo como agente progestacional en relación a su precursor, la progesterona (23). Además, debido a que los esteroides 20 $\alpha$ -reducidos son sustratos débiles para la C17-C20 liasa, la actividad de la 20 $\alpha$ -HSD puede también jugar un papel significativo en la determinación de la cantidad de esteroides C<sub>21</sub> disponibles como sustrato para la conversión a andrógenos por las células foliculares.

#### CELULAS ESTEROIDOGENICAS, ORIGENES Y FUNCIONES.

En todas las especies de mamíferos, las principales células implicadas en la esteroidogénesis ovárica son de dos tipos básicos: (a) células que responden a LH, las cuales corresponden a las de la teca interna e intersticiales, y (b) células que responden a FSH, que comprenden exclusivamente a las de la granulosa, las cuales también adquieren, aunque tardíamente, la capacidad de responder a LH, transformándose así en células luteinizadas. Estos dos tipos de células participan en la regulación de todo el proceso de esteroidogénesis ovárica, en virtud de sus

diferencias en la expresión de las enzimas esteroidogénicas y sus diferentes hormonas reguladoras (24).

Ambos tipos de células parecen diferir en su origen embriológico. Se ha propuesto que las células de la granulosa deriven principalmente de ciertas células mesonéfricas del rete ovarii (25,26). El desarrollo folicular temprano ocurre en la parte más interna de la corteza ovárica, cuando las células mesonéfricas reticulares alcanzan y rodean a los ovocitos, diferenciándose entonces en células de la granulosa, las cuales organizan los folículos primordiales (Fig. 4).

Una vez que el folículo está formado y que la membrana basal folicular encierra a las células de la granulosa, éstas proliferan para dar lugar a la membrana granulosa. Posteriormente, cuando el folículo antral se desarrolla, estas células se organizan en regiones morfológicamente distinguibles (i.e., células de la corona radiada, células del cuanulus y células murales o parietales), las cuales tienen diferentes funciones. Las células murales adyacentes a la membrana basal folicular son las primeras en diferenciar su respuesta esteroidogénica a LH, basada en la adquisición de sitios de unión a LH y en la expresión de la actividad de  $3\beta$ -HSD.

Debido a que la teca no existe en los folículos primarios, pero aparece cuando éstos crecen y maduran, es evidente que las células tecales se originan continuamente a lo largo de la vida reproductiva. Las células tecales

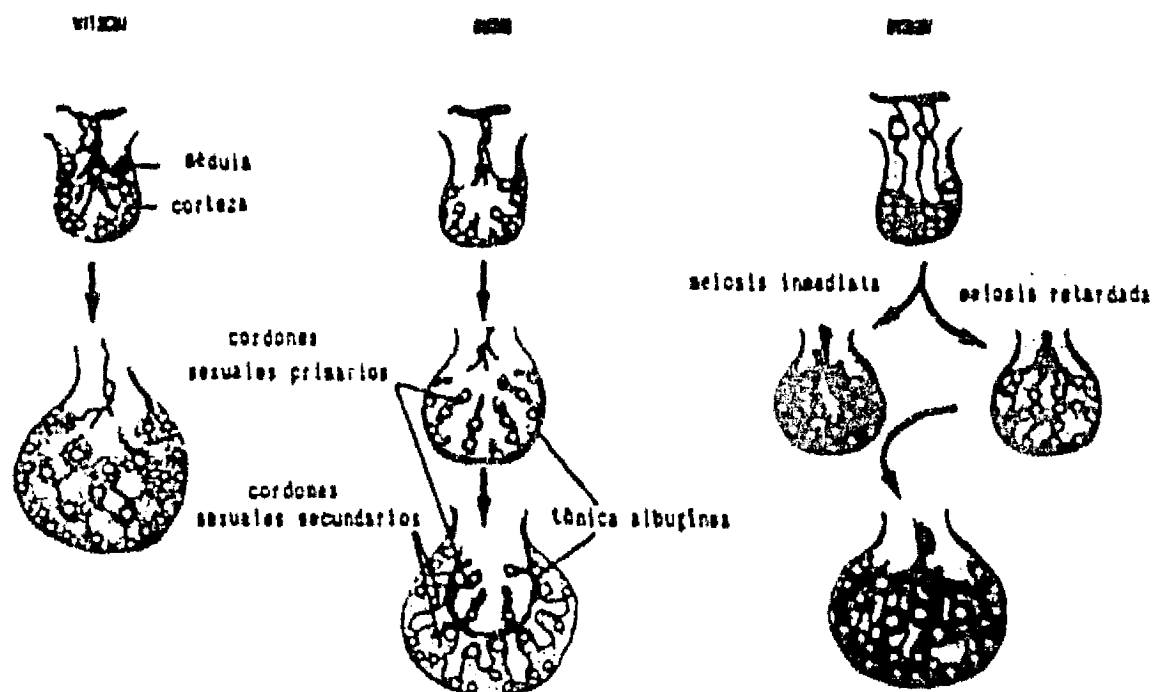


Figura 4. Modelos propuestos para la diferenciación ovárica. Witschi y Burns sugieren que las células somáticas del ovario derivan principalmente del epitelio superficial, mientras que Byskov propone un origen mesonefrico. El modelo de Witschi involucra la degeneración de la médula y la proliferación de la corteza. Burns sugiere que la proliferación secundaria del epitelio superficial forma los cordones sexuales secundarios, que contribuyen a la poza de las células somáticas. En el modelo de Byskov se distinguen dos estadios transitorios de diferenciación ovárica, basados en el inicio de la meiosis (inmediata y retardada). En ambos casos, se propone que las células derivadas del mesonefros den lugar a la mayoría de las células ováricas (Modificado de la referencia 28).



parecen diferenciarse a partir de las células mesenquimatosas del estroma ovárico (26).

Se ha sugerido que las células intersticiales primarias puedan ser formadas de ciertas células del rete intraovárico, que inicialmente están contiguas a las células formadoras de la granulosa, pero que se disocian del ovocito cuando el folículo se encapsula. Las células intersticiales secundarias, encontradas en el ovario adulto, se derivan de las células tecales de los folículos atrésicos. Con estas bases, ciertas homologías en la función de las células de la teca y las células intersticiales del ovario adulto, pueden ser esperadas (24).

#### Cooperación de las células de la teca y de la granulosa.

En 1959, Falck aportó las primeras evidencias experimentales que condujeron a proponer la "teoría bicelular" para explicar cómo es que las células ováricas cooperan en la biosíntesis de estrógenos (27). Esta teoría ha sufrido una serie de reformulaciones y actualmente es propuesta como la teoría de cooperación celular por "dos células, dos gonadotropinas", que regula la biosíntesis ovárica de estrógenos (24).

Esta teoría postula que en el ovario adulto, las células de la teca interna (y quizá también las células intersticiales) al ser estimuladas por la LH, responden aumentando la producción de andrógenos aromatizables, los

cuales deben atravesar la membrana basal folicular para ser aromatizados por las células de la granulosa, en una reacción estimulada por la FSH. Este concepto ha sido aceptado como válido para el folículo antral y el preovulatorio, en la mayor parte de las especies, a pesar de encontrar algunas veces producción significativa de estrógenos por las células tecales de algunas de ellas (21). Sin embargo, falta mucho por conocer acerca de las capacidades esteroidogénicas y su regulación en estos tipos celulares. Puesto que además, existen reportes de subpoblaciones de células de la granulosa de ovario de rata, que pueden distinguirse en relación a la expresión de antígenos de superficie o bien con respecto a su sensibilidad diferencial a la FSH y al péptido intestinal vasoactivo (VIP) (28,29).

#### ESTEROIDOGENESIS POR EL OVARIO EN DESARROLLO.

Para que el ovario adulto sea funcional, se requiere que ocurran tres eventos principales durante los estadios tempranos de la gonadogénesis: iniciación de la meiosis, formación de los folículos y diferenciación de las células productoras de esteroides. Tales eventos pueden no ocurrir secuencialmente.

### El ovario prefolicular.

Esta fase no representa propiamente un estadio folicular, sino más bien un periodo breve en la organogénesis ovárica, previa al establecimiento de la foliculogénesis, el proceso mediante el cual las células germinales se asocian con las foliculares para formar los folículos primordiales. Esta fase prefolicular puede ocurrir en la vida embrionaria, neonatal, o en estadios prepuberales tardíos, dependiendo de la especie.

En los siguientes párrafos se describirán brevemente algunos ejemplos de esteroidogénesis prefolicular.

La síntesis de esteroides por el ovario prefolicular de roedor es muy limitada. El ovario de la rata, que empieza a formar folículos en el primer día postnatal, aunque puede sintetizar estrona desde el día 18 de gestación, no responde en este periodo al estímulo por gonadotropinas, pero sí al dcAMP (30,31). Sin embargo, en el ovario fetal del ratón (18 días postcóbite) se ha observado que la FSH estimula la actividad de aromatasas, no obstante que en esta especie la foliculogénesis se inicia en el segundo día del neonato (32).

En contraste a los estudios en roedores, el ovario prefolicular de pollo muestra una actividad esteroidogénica muy intensa, con abundante síntesis de  $17\beta$ -estradiol que se manifiesta desde los 7-10 días de edad embrionaria (33). En

esta especie, los folículos se forman a los 7 días después del nacimiento.

Por otra parte, los ovarios prefolliculares del conejo, oveja, y vaca, aunque esteroideogénicamente activos, muestran un patrón intermedio a los descritos anteriormente en relación a la síntesis de esteroides. Los estudios en conejo demuestran que la síntesis ovárica de estradiol, a partir de testosterona, se inicia desde el día 18 de la gestación. Otros estudios muestran que solamente después de que los folículos se han formado, las gonadotropinas son capaces de estimular la producción de progesterona en cultivos de células de la granulosa de conejo. En esta especie, la foliculogénesis comienza en el día 14 de edad neonatal.

En el ovario de bovino, la foliculogénesis comienza alrededor del día 95 de vida fetal. La producción de estradiol ha sido detectada desde los  $45 \pm 3$  días de edad fetal, pero es bifásica y subsecuentemente declina (34). El establecimiento de la producción de estradiol ovárico ocurre cuando el sexo de las gónadas embrionarias ya es morfológicamente distinguible. Además, la producción in vitro del estradiol es susceptible de ser estimulada por LH (34). La progesterona y las prostaglandinas también son producidas tempranamente, desde el día 30 de la gestación (35). Por otro lado, experimentos recientes (36,37) realizados en células aisladas de corteza y médula ováricas de fetos de bovino de 4 a 10 cm de longitud coronilla-rabadilla (CRL) (45 a 75 días de gestación) no se observaron

fmol de  $17\beta$ -estradiol formado/ $1 \times 10^6$  células/ hora, al utilizar testosterona tritiada como sustrato. Sin embargo, cuando se estudió el metabolismo de pregnenolona-[7- $^3$ H], los resultados mostraron que ambas preparaciones celulares (corteza y médula) eran capaces de sintetizar estrógenos, lo que indicaba que las enzimas involucradas en la vía esteroidogénica estaban presentes desde etapas tempranas del desarrollo. Por otra parte, al establecer como índice de la actividad de la  $3\beta$ -hidroxisteroide deshidrogenasa/5-4 isomerasa ( $3\beta$ -HSD) la relación entre los principales metabolitos de la vía de los delta-4 con la de los delta-5, se observó una mayor actividad de dicho complejo en la médula ovárica con respecto a la corteza, sugiriendo la existencia de poblaciones celulares con diversas capacidades esteroidogénicas.

En estadios gestacionales tardíos en el bovino (un mes antes de término), los ovarios convierten in vitro la  $^{14}$ C-progesterona en varios metabolitos hidroxilados de los esteroides  $C_{19}$  y  $C_{17}$ , así como también transforman androstenediona en testosterona y estradiol (38).

De los antecedentes descritos anteriormente, podemos distinguir en el ovario prefolioular tres patrones de actividad esteroidogénica: limitada, intensa e intermedia; las cuales pueden ser representadas por la rata, el pollo y el bovino, respectivamente.

el desarrollo normal del fenotipo femenino, se ha propuesto que éstos puedan jugar un papel local en el desarrollo del ovario (39).

Desde que fue postulada la teoría bicelular para explicar la cooperación celular en la síntesis de estrógenos por el folículo ovárico, ésta ha sido demostrada, aunque con ligeras variaciones, en la mayor parte de las especies estudiadas. Además de la síntesis de estrógenos, se han reportado otras formas de sinergismo entre las células foliculares para el metabolismo de esteroides. Ejemplo de ello lo encontramos con los estudios realizados en la yegua, el hamster, la rata, el cerdo y el pollo, en donde se aportan evidencias que indican que los esteroides  $C_{19}$  pueden ser producidos en la capa granulosa y ser metabolizados a andrógenos por las células de la teca (5,24). Resulta evidente que aún faltan estudios para conocer todas las capacidades esteroidogénicas de las células competentes.

Esta falta de información es más notable en el ovario en desarrollo, en donde si bien es cierto que en muchas especies ha sido demostrado que el ovario prefolicular es esteroidogénicamente activo, hasta la fecha ni siquiera se ha reportado cuales son las células responsables de esta actividad, ni cuales son los factores que participan en la expresión de la diferenciación endócrina de la gonada en desarrollo. Por lo cual, resulta indispensable identificar las células involucradas en este proceso, así como profundizar en la comprensión del mismo, lo que puede permitir un mejor entendimiento de los mecanismos de

diferenciación celular, y de regulación enzimática. Por tal motivo, en un intento por conocer y caracterizar las células esteroidogénicas del ovario prefolicular en desarrollo, tomando como modelos al pollo recién nacido y al feto de bovino, el presente trabajo pretende los siguientes:

### OBJETIVOS

#### GENERAL

1. Identificar que tipos de células, en el ovario prefolicular, participan en la síntesis de esteroides y establecer sus capacidades esteroidogénicas.

#### PARTICULARES

En el ovario del pollo recién nacido:

1. Determinar si el uso de la técnica de separación, mediante gradientes de densidad, es útil para aislar subpoblaciones de células esteroidogénicas.
2. Identificar las características morfológicas de las poblaciones celulares, resultantes de la separación por gradientes de densidad.



3. Establecer si las células que secretan andrógenos, pueden secretar también estrógenos; tomando como indicadores a la testosterona y al  $17\beta$ -estradiol, respectivamente.
4. Determinar en las diferentes subpoblaciones que se identifiquen, la capacidad de respuesta a la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG); tomando como criterio, la estimulación en la secreción de la testosterona y el  $17\beta$ -estradiol.
5. Identificar en las poblaciones celulares, resultantes de la separación por gradientes de densidad, los posibles destinos metabólicos de la testosterona.

En el ovario fetal del bovino:

1. Determinar si el ovario de fetos de bovino de 4 a 10 cm CRL, posee la capacidad enzimática para sintetizar el  $17\beta$ -estradiol y la estrona, a partir de pregnenolona, dehidroepiandrosterona, testosterona y androstenediona.
2. Establecer si existen diferentes capacidades esteroidogénicas entre la corteza y la médula ováricas, estudiando la actividad de las enzimas  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/5-4 isomerasa,  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y aromatasas, mediante

mencionados.

3. Identificar si en los ovarios de fetos de bovino de 4 a 10 cm CRL, existen cambios en la actividad de las enzimas anteriormente descritas, en función de la longitud CR.

## TRABAJO EXPERIMENTAL

Para la realización de este trabajo se emplearon 2 modelos de ovario prefolicular: el del pollo recién nacido y el del feto de bovino. Los resultados obtenidos de estos estudios son presentados por separado a manera de una pequeña síntesis del trabajo publicado y del enviado a publicación, los cuales se presentan íntegramente al final del presente documento. Finalmente, se presenta una discusión integral.

### OVARIO DE POLLO RECIÉN NACIDO.

#### Materiales y Métodos.-

La tripsina y el medio de cultivo de Eagle, modificado por Dulbecco (DMEM), fueron obtenidos de Grand Island Biological Co. (Grand Island, NY). El inhibidor de la tripsina, la albúmina sérica bovina (BSA), la 1-metil-3-isobutilxantina (MIX), la metrizamida, la gonadotropina coriónica humana (hCG), la testosterona, la 4-androsten-3,17-diona, la androsterona, la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, la dehidroepiandrosterona, la estrona y el 17 $\beta$ -estradiol fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El Sephadex LH-20 fue obtenido de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden). Los antisueros anti-testosterona y anti-17 $\beta$ -estradiol fueron comprados a Radioassay Inc. (Carson, CA). La [1,2,6,7-<sup>3</sup>H]-testosterona (94 Ci/mmol) y el [2,4,6,7-<sup>3</sup>H]-

17 $\beta$ -estradiol (92 Ci/mmol) fueron obtenidos de Amersham International (Buckinghamshire, England). La (7-<sup>3</sup>H)-testosterona (29 Ci/mmol) fue obtenida de New England Nuclear (Boston, MA). La cromatografía en capa fina fue realizada en cromatofolios Al de sílica gel G50, con indicador fluorescente F<sub>254</sub> (Merck, México).

Los pollos recién nacidos, de las razas Leghorn (Babcock B300) y Rhode Island (Welpine), fueron obtenidos de granjas locales y estudiados dentro de las 24 horas posteriores a la eclosión.

En todos los casos, los ovarios del lado izquierdo fueron disecados y posteriormente incubados en una solución de tripsina al 0.25%, libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. Esta incubación se realizó a 37°C, con agitación, durante 10, 20 y 30 minutos. Las células disgregadas después de estos tiempos, fueron tratadas con inhibidor de tripsina al 0.5% en medio DMEM, seguido por dos cambios de medio DMEM, con BSA al 0.1%.

Las células ováricas, disgregadas después de 30 minutos de incubación con tripsina, se aplicaron a un gradiente de metrizamida (0-30%). Para cada 5 ml de gradiente, se aplicaron de 30 a 50 millones de células. Después de ser centrifugadas a 4,000 x g durante 7 min., se colectaron fracciones de 0.4 ml, desde la parte superior del tubo.

Las suspensiones de células ováricas fueron incubadas a 37°C, en 1 ml de DMEM con BSA al 0.1% y 0.1 mM de MIX, durante 120 min. Con el propósito de estimular la secreción

de hormonas esteroides, en algunos casos se agrega 1.0 IU de hCG a las suspensiones celulares. La secreción de la testosterona y del <sup>17β</sup>-estradiol, cuantificada por radioinmunoanálisis, se utilizó como indicador de la actividad esteroidogénica.

El metabolismo de la testosterona fue evaluado en cada fracción del gradiente de densidad que contenía células. Las suspensiones celulares fueron incubadas como se indicó previamente, pero se añadió 0.5 µCi de (7-<sup>3</sup>H)-testosterona y 1.0 UI de hCG. La separación de los metabolitos de la testosterona fue realizada por tres procedimientos cromatográficos. La concordancia de los resultados obtenidos en los 3 procedimientos, se tomó como evidencia para la identificación de los esteroides.

#### RESULTADOS

Los resultados mostraron que:

- 1.- Con base en sus características morfológicas, las células disgregadas del ovario fueron clasificadas en tres tipos: (i) células que contenían gotas de lípidos en el citoplasma, (ii) células que no contenían gotas de lípidos y (iii) células germinales. La proporción de los tres tipos de células se modificó en función del tiempo de incubación con tripsina. Mientras que el porcentaje de los ovocitos decreció hacia los 30 minutos, los otros dos tipos de células incrementaron (ver la tabla 1 del artículo, p.155). La máxima

secreción del  $17\beta$ -estradiol fue observada en la suspensión de células obtenidas después de 30 minutos de incubación con tripsina (ver la fig. 1 del artículo, p.155).

- 2.- Las células ováricas respondieron a la hCG, incrementando la secreción tanto de la testosterona como del  $17\beta$ -estradiol. La curva de dosis respuesta (ver fig. 2, p.155) mostró que 1.0 UI de hCG es suficiente para observar el efecto estimulador, ya que la dosis media efectiva ( $ED_{50}$ ), para la secreción de la testosterona y del  $17\beta$ -estradiol, fue 0.64 y 0.25 UI/ml, respectivamente. Además, la estimulación de la secreción del  $17\beta$ -estradiol se mantuvo hasta las 8 horas (ver la fig. 3, p. 156).
- 3.- De las fracciones colectadas del gradiente de densidad, 6 contenían células. La fracción II del gradiente (1.080 g/ml), contenía una población pura, de células con lípidos. Mientras que en la fracción VI (1.150 g/ml) del gradiente, predominaron las células sin lípidos (ver la fig. 4, p.156).
- 4.- Las células ováricas de todas las fracciones resultantes del gradiente de densidad, fueron positivas para la reacción histoquímica de la  $3\beta$ -HSD. Sin embargo, el mayor porcentaje de positividad se observó

en las células de la fracción II del gradiente de densidad (ver la fig. 5, p. 156).

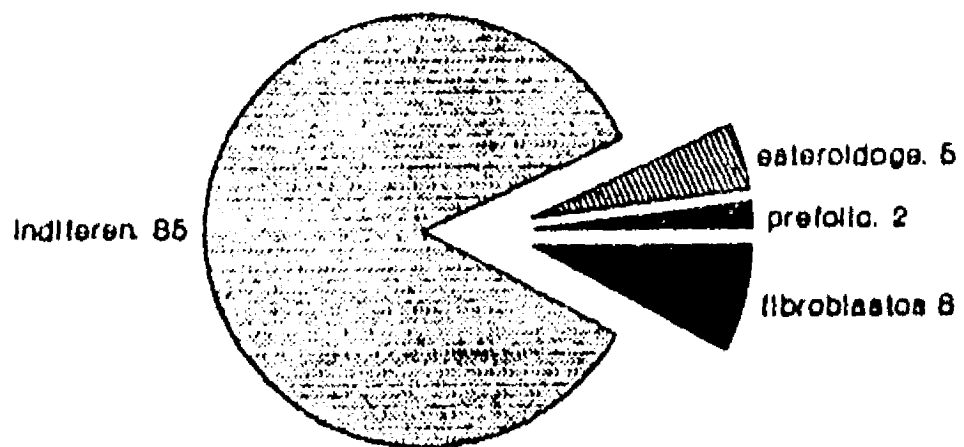
5.- Las células que secretan andrógenos (fracción II del gradiente de densidad), tienen las características morfológicas de una célula esteroidogénica típica (ver la fig. 6, p. 157).

6.- En la fracción VI del gradiente de densidad, se observó la máxima capacidad de secreción y síntesis de  $17\beta$ -estradiol. En esta fracción, se distinguieron por sus características morfológicas 4 tipos celulares (ver la fig. 6, p. 157 y la fig. 5 de la presente sección):

- a).- células prefolliculares.
- b).- células esteroidogénicas típicas.
- c).- fibroblastos.
- d).- células relativamente indiferenciadas.

7.- Se observó una adecuada correlación entre las células con gotas citoplásmicas de lípidos (células esteroidogénicas típicas) y la cantidad de testosterona secretada. Igualmente, se observó una mejor correlación entre las células sin gotas citoplásmicas de lípidos (células relativamente indiferenciadas) y la secreción del  $17\beta$ -estradiol (ver la fig. 7, p. 158).

### CELULAS DE LA FRACCION VI DEL GRADIENTE



Los valores representan el % del total

FIGURA 5



- 8.- En todas las fracciones celulares, derivadas del gradiente de densidad, se observaron diferencias en la secreción basal de testosterona y  $17\beta$ -estradiol, respecto a la estimulada con hCG, lo que hace suponer la presencia de receptores funcionales para esta gonadotropina (ver la fig. 8, p. 159).
- 9.- El metabolismo de la testosterona, por las diferentes poblaciones, mostró que en las células de la fracción II del gradiente, el principal metabolito formado fue la androstenediona (14.35 %), indicando la presencia de la enzima  $17\beta$ -HSD. Por otro lado, aunque las células de la fracción VI del gradiente sintetizaron  $17\beta$ -estradiol (2.0%), fue mayor la producción de estrona (10.75%), sugiriendo que bajo las condiciones experimentales empleadas, la  $17\beta$ -HSD favorece la formación de estrona. Además, en las fracciones IV, V y VI se sintetizaron grandes cantidades (26.3-56.5%) de otros esteroides no identificados (ver la tabla 2, p. 160).
- 10.- Fue posible la separación de células que producen y secretan andrógenos de las que producen y secretan estrógenos.

## OVARIO FETAL DE BOVINO.

### Materiales y métodos.-

El medio de cultivo, los esteroides radiactivos y los reactivos, fueron obtenidos como se indicó en los experimentos de pollo.

En relación al modelo de bovino, se emplearon ovarios de fetos de bovino de 4 a 10 cm de longitud coronilla-rabadilla (CRL), que corresponden a una edad gestacional aproximada de 47 a 75 días.

Los fetos de bovino tipo cebú (Bos indicus) fueron colectados en el Rastro de Ferrería de la Dirección General de Abasto del D.F., seleccionando a las hembras, cuyo sexo fue determinado por las características morfológicas del ovario.

Las gónadas se disecaron ahí mismo, sumergiéndolas inmediatamente en medio de cultivo Dulbecco-albúmina al 1% y se mantuvieron a temperatura ambiente (2 a 4 horas), hasta iniciar la disgregación celular.

### Preparación de las poblaciones celulares.

Se procedió a separar la corteza de la médula de cada par de ovarios, utilizando agujas de disección. Con el objeto de disgregar las células de cada región, éstas se incubaron por separado en una solución de tripsina al 0.25% libre de calcio y magnesio. Esta incubación se realizó a

37°C, con agitación, durante 10 minutos. Posteriormente, a la suspensión celular se le agregó inhibidor de tripsina al 0.5%, seguido de dos lavados con medio de cultivo Dulbecco-albúmina al 1%.

#### Metabolismo de precursores marcados con tritio.

Para conocer la capacidad esteroidogénica de cada preparación celular ovárica, se utilizaron los siguientes precursores: pregnenolona [7-<sup>3</sup>H] (P<sub>0</sub>), dehidroepiandrosterona-[1,2-<sup>3</sup>H] (DHEA), 4-androsten-3,17-diona-[1,2,6,7-<sup>3</sup>H] (A<sub>0</sub>), y testosterona-[1,2,6,7-<sup>3</sup>H] (T). Las preparaciones obtenidas de corteza y de médula, fueron incubadas durante una hora, a 37°C, con cada uno de los precursores tritiados. La transformación de DHEA en otros metabolitos (A<sub>0</sub>, T y estrógenos) se consideró como indicador de la actividad de la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/5-4 isomerasa (3β-HSD), mientras que la producción del 17β-estradiol y de la testosterona, a partir de la A<sub>0</sub>, fue considerado como índice de la actividad de la enzima 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD). La producción del 17β-estradiol y de la estrona, a partir de A<sub>0</sub> y de T, fueron considerados como indicador de la actividad de la aromatasa.

Adicionalmente, algunos ovarios fueron procesados para detectar la actividad histoquímica de la 3β-HSD, utilizando DHEA como sustrato.

## RESULTADOS

De estos experimentos, los resultados mostraron que:

- 1.- Cuando se utilizó la pregnenolona tritiada como sustrato, fueron identificados diversos esteroides como productos, incluyendo progestinas, andrógenos y estrógenos (ver la tabla 1 del manuscrito de bovino). Estos resultados indican que las enzimas que participan en la síntesis tanto de andrógenos como de estrógenos, están presentes en ambas regiones del ovario fetal. Además, la proporción de esteroides C<sub>19</sub> fue mayor en la región cortical, respecto de la medular (ver la tabla 2 del manuscrito). También, se encontró una mayor síntesis de los esteroides de la vía de los delta 4 en la región medular, respecto de la cortical (ver la tabla 2 del manuscrito), sugiriendo una mayor actividad de la 3 $\beta$ -HSD en la médula ovárica.
- 2.- Cuando se evaluó la actividad de la 3 $\beta$ -HSD, mediante el uso de la DHEA tritiada, la región medular mostró una mayor actividad con respecto a la corteza ovárica (ver la fig. 1 del manuscrito). De igual manera, la reacción histoquímica para la 3 $\beta$ -HSD, utilizando como precursor a la dehidroepiandrosterona, fue positiva en la región de la médula yuxtacortical (ver la fig. 2 del manuscrito).

- 3.- Cuando se estudió la actividad de la  $17\beta$ -HSD, utilizando androstenediona como sustrato, dicha actividad fue mayor en la región medular, respecto de la corteza ovárica (ver la fig. 3 del manuscrito).
- 4.- Aunque la actividad de la enzima aromatasa mostró una distribución homogénea en ambas regiones ováricas, se observó un ligero predominio en la médula de todas las edades estudiadas, indistintamente de que se utilizara androstenediona o testosterona como sustrato (ver las figs. 4 y 5 del manuscrito).
- 5.- En ambas regiones ováricas, fue mayor la biosíntesis de estrona que la del  $17\beta$ -estradiol, utilizando como precursor a la androstenediona. Lo que indica que la  $17\beta$ -HSD favorece la formación de la estrona, bajo las condiciones experimentales utilizadas (ver la tabla 3 del manuscrito).
- 6.- La mayor actividad esteroidogénica, por ambas regiones ováricas, fue observada en el período comprendido entre los 4 y 6 cm CRL. Posteriormente, estas actividades declinaron a valores casi indetectables, indistintamente de la región estudiada (ver las figs. del manuscrito: 1,3,4 y 5).

7.- Existe una distribución asimétrica en la actividad de las enzimas evaluadas. Es decir, la actividad de la 3 $\beta$ -HSD y de la 17 $\beta$ -HSD predominaron en la médula ovárica, mientras que la actividad de la aromatasa no mostró diferencias importantes entre la corteza y la médula.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las suspensiones celulares, obtenidas del ovario prefollicular del pollo, secretaron y sintetizaron esteroides, tanto en condiciones basales como estimuladas con hCG. Estos resultados indican que el procedimiento utilizado para disgregar las células de la gónada, es adecuado, ya que permite obtener células ováricas funcionales.

En el ovario fetal del bovino, la funcionalidad de las células ováricas fue inferida por su capacidad para sintetizar esteroides bajo condiciones basales, ya que no se determinó la síntesis en presencia de la gonadotropina bovina, bLH. Sin embargo, el periodo durante el cual se observó mayor síntesis del 17 $\beta$ -estradiol, concuerda con el reportado en la literatura (34), lo cual apoya nuestros resultados.

La técnica de separación celular, mediante gradientes de densidad con metrizamida, fue apropiada para purificar del ovario del pollo recién nacido, una población de células (fracción II del gradiente) que secretan a la testosterona, pero que no sintetizan ni secretan al 17 $\beta$ -estradiol. Por otro lado, mediante las condiciones experimentales utilizadas, no fue posible purificar a las células productoras de estrógenos, solamente se logró obtener una fracción enriquecida (células de la fracción VI).

Las células obtenidas de la fracción II del gradiente de densidad, mostraron las características morfológicas de las células esteroidogénicas típicas. Este tipo de células han sido previamente localizadas en la médula ovárica (40,41). De las células identificadas en la fracción VI del gradiente, las que mostraron una mejor correlación entre la secreción de  $17\beta$ -estradiol y el número de células, fueron las relativamente indiferenciadas. Estas células son el principal componente de la médula ovárica del pollo recién nacido (42).

Por lo tanto, se concluye que en la médula ovárica del pollo recién nacido, las células morfológicamente esteroidogénicas producen andrógenos, pero no estrógenos, mientras que las células relativamente indiferenciadas secretan al  $17\beta$ -estradiol.

Tanto la testosterona como la androstenediona, han sido utilizadas previamente como sustratos para detectar la actividad de la aromatasa, en las preparaciones de ovario prefolicular (30,31). En nuestros experimentos con el ovario del pollo, el metabolismo de la testosterona por las células de la fracción II del gradiente, mostró nula actividad de la aromatasa, mientras que las de la fracción VI, mostraron la mayor actividad de esta enzima. Estos datos concuerdan con los estudios de secreción del  $17\beta$ -estradiol, cuantificado por radioinmunoanálisis, indicando que las células de la fracción VI no sólo secretan al  $17\beta$ -estradiol, sino que también lo sintetizan. Además, en todas las fracciones



células del gradiente, en que se encontró actividad de aromatasa, se observó una mayor acumulación de la estrona en relación al 17 $\beta$ -estradiol. Estos resultados indican que, bajo las condiciones de ensayo utilizadas, la reacción catalizada por la 17 $\beta$ -HSD favorece la formación de la estrona.

En el feto del bovino, la actividad de la aromatasa, evaluada por el metabolismo de la androstenediona y de la testosterona, tuvo valores similares tanto en la corteza como en la médula ováricas, indicando que las células productoras de estrógenos, se encuentran uniformemente distribuidas en ambas regiones.

El índice de actividad de la enzima 17 $\beta$ -HSD, evaluada por la formación de T y 17 $\beta$ -estradiol, a partir de la androstenediona, fue mayor en la médula ovárica en relación a la corteza. Estas diferencias fueron observadas en los ovarios de fetos de bovino de 4 a 6 cm CRL. El ovario de fetos más grandes no mostró diferencias, entre ambas regiones, en la actividad de esta enzima.

Es interesante resaltar que cuando se estudió el metabolismo de la testosterona en el pollo recién nacido, la estrona se produjo en mayor proporción que el 17 $\beta$ -estradiol, mientras que en el feto del bovino, solamente se sintetizó el 17 $\beta$ -estradiol, indicando diferencias de especie en el comportamiento de la enzima 17 $\beta$ -HSD.

Cuando se detecta la actividad de aromatasa en el ovario prefollicular, se ha observado que pueden ser

sintetizados tanto la estrona como el  $17\beta$ -estradiol, encontrándose un predominio en la síntesis ya sea del  $17\beta$ -estradiol (43,44) o de la estrona (30). Los resultados presentes indican que tanto en el caso de bovino como en el del pollo, se sintetiza más estrona que  $17\beta$ -estradiol.

El metabolismo de la testosterona por las células ováricas del pollo, derivadas de las fracciones IV, V y VI del gradiente, mostró gran producción de la  $5\alpha$ -androsterona y de otros esteroides no identificados. Dicha producción fue mayor con las células de la fracción IV y V del gradiente, respectivamente (Fig.6). Estos resultados sugieren la existencia de otra población de células esteroideogénicas, diferente de las formadoras de estrógenos y de las que secretan testosterona. Esta posibilidad es apoyada por los reportes de que en la gónada embrionaria del pollo, se han encontrado diferencias en el comportamiento ontogénico de las actividades de aromatasa, de  $17\alpha$ -hidroxilasa y de C17-C20 liasa (33). Además, aunque en el ovario adulto de esta especie, dichas actividades residen solamente en las células de la teca, se han identificado en esta región, subpoblaciones de células esteroideogénicas (45,46).

En relación a los esteroides no identificados en las preparaciones celulares del pollo recién nacido, éstos han mostrado una movilidad similar con la  $5\alpha$ -androstandiona, cuando son separados por cromatografía en capa fina bajo dos diferentes sistemas de disolventes. Sin embargo, la cristalización de este esteroide ofrecería una prueba más

## SINTESIS DE ANDROGENOS

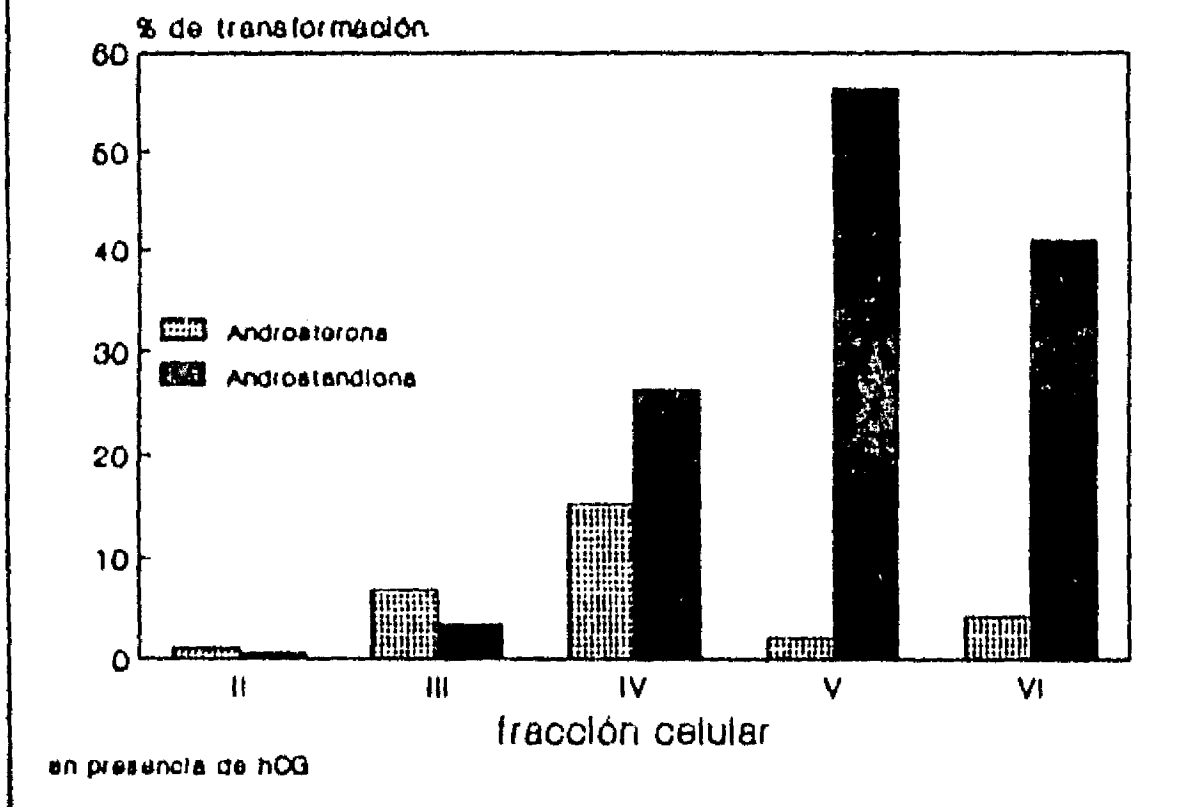


Figura 8. Síntesis de andrógenos  $5\alpha$ -reducidos por las diferentes poblaciones celulares aisladas del gradiente de densidad. Las células derivadas del gradiente de densidad fueron incubadas por duplicado con testosterona-[7- $^3$ H] y hCG (1.0 IU/ml), durante 2 horas a  $37^\circ\text{C}$ , en 1 ml como volumen final. El número de células totales fue diferente para cada fracción celular ( $0.108$ ,  $0.223$ ,  $0.368$ ,  $0.769$ ,  $1.870 \times 10^6$  células, para las fracciones II, III, IV, V y VI, respectivamente). Los resultados son expresados como porcentaje de transformación hacia cada metabolito,  $5\alpha$ -androsterona y posiblemente  $5\alpha$ -androstandiona. Como puede observarse, la mayor producción de androsterona ocurrió en la fracción IV del gradiente, mientras que la que más androstandiona formó fue la fracción celular V.

concluyente. Esta posibilidad es apoyada por la observación de que la reducción enzimática de los esteroides 4-en-3-oxo, tanto de los esteroides  $C_{19}$ , como de los  $C_{21}$ , ocurre en el tejido ovárico de diversas especies (5).

La actividad de la  $3\beta$ -HSD del ovario fetal del bovino, evaluada con el metabolismo de la dehidroepiandrosterona, fue mayor en la médula, respecto de la corteza. Este hallazgo fue también observado con el índice de la  $3\beta$ -HSD, estimada con el metabolismo de la pregnenolona y con la localización histoquímica de esta actividad, en la región de la médula yuxtacortical.

Estos resultados nos indican que en el ovario de fetos de bovino, no fue paralela la distribución regional de las enzimas aromatasa,  $17\beta$ -HSD y  $3\beta$ -HSD, lo que sugiere que, como sucede en el ovario folicular de la rata (47), y en el ovario de pollo recién nacido, el ovario fetal de bovino contiene diferentes tipos de células que participan en el proceso esteroideogénico.

La capacidad del ovario fetal del bovino para sintetizar esteroides, fue mayor en el periodo comprendido entre los 4 y 6 cm CRL, una observación que concuerda con los reportes en donde se midió, por radioinmunoanálisis, la secreción in vitro del  $17\beta$ -estradiol (34).

La duración de la actividad esteroideogénica, del ovario prefolicular de mamíferos, es generalmente transitoria (48-50). No obstante, en la rata, la actividad de la  $3\beta$ -HSD no parece disminuir una vez que se presenta, desde la etapa

fetal (51). De igual manera, en el ovario prefoliular del pollo, la síntesis del 17 $\beta$ -estradiol aparece desde los 7 días de vida embrionaria, y se mantiene hasta que se forman los folículos (52,53).

La presencia de receptores funcionales para gonadotropinas, en las poblaciones celulares aisladas del ovario del pollo recién nacido, fue sugerida por las diferencias en la secreción basal de testosterona y de 17 $\beta$ -estradiol, respecto a la estimulada con hCG. Sin embargo, la presencia de los receptores debe demostrarse midiendo directamente la unión a ligando.

En el ovario de fetos de bovino no se estudió la respuesta a las gonadotropinas, pero reportes previos han mostrado que este tejido incrementa la secreción in vitro del 17 $\beta$ -estradiol en respuesta a la bLH (34), lo que sugiere que también en esta especie, existen receptores funcionales para LH.

Cuando se evaluaron los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) de la 17 $\beta$ -HSD, en presencia y en ausencia de hCG, los resultados mostraron que en las células ováricas del pollo, la actividad de esta enzima no es modificada por esta gonadotropina (Fig.7). Una observación que concuerda con lo esperado, ya que se ha reportado que la FSH es la gonadotropina que estimula la actividad de esta enzima (54).

El hecho de demostrar que el ovario prefoliular tiene la capacidad de sintetizar esteroides in vitro, indica que las vías esteroidogénicas de este tejido son funcionales.

## ACTIVIDAD DE 17 $\beta$ -HSD Fracción VI del gradiente

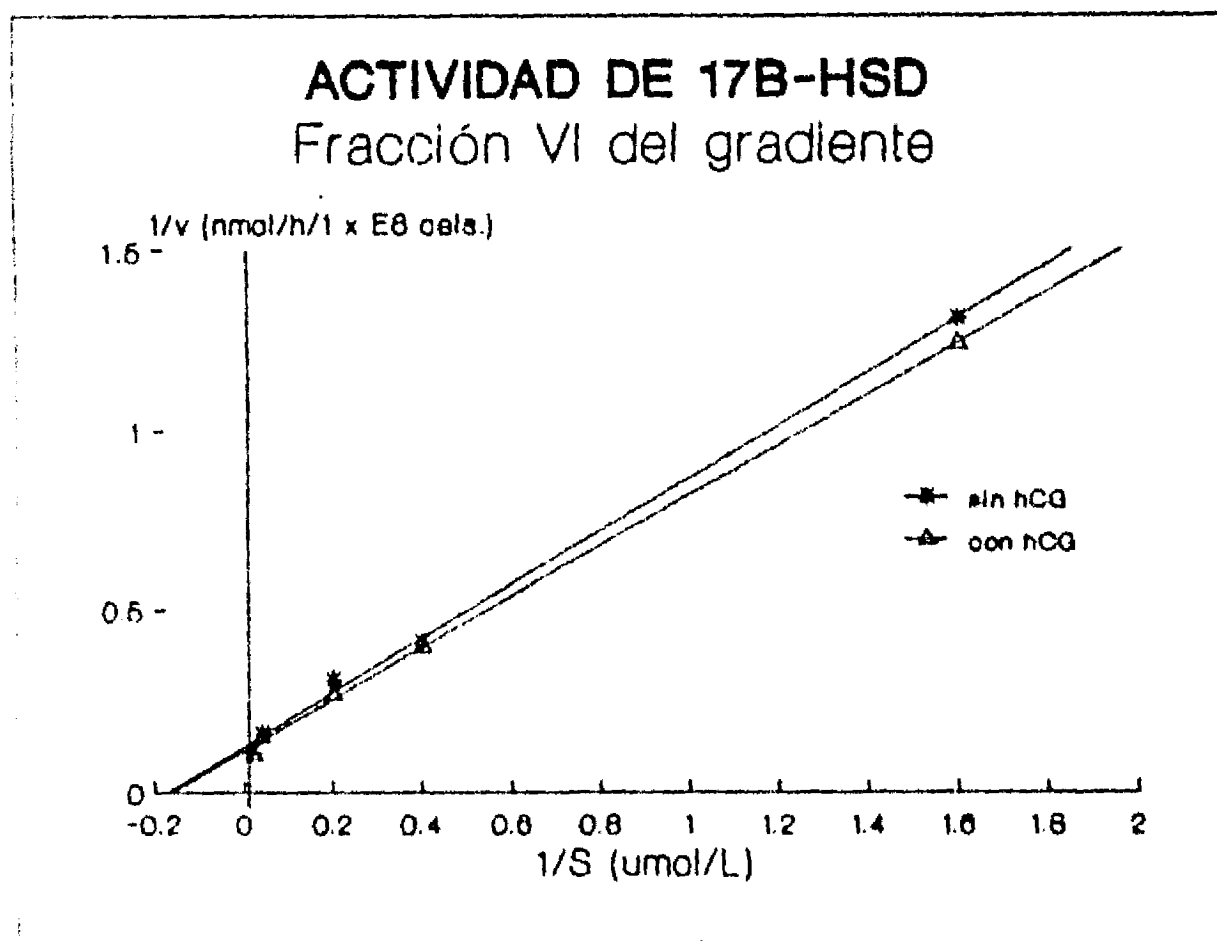


Figura 7. Comportamiento cinético de la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ -HSD) en las células de la fracción VI. Las células derivadas de la fracción VI del gradiente de densidad fueron incubadas por duplicado con diferentes concentraciones de testosterona, en presencia o en ausencia de hCG (1.0 IU/ml), durante 1 hora a 37°C, en 1 ml como volumen final. La actividad de la enzima fue evaluada mediante la determinación de androstenediona formada, expresando la velocidad en nmol/h/1 x 10<sup>6</sup> células con lípidos. Las constantes cinéticas aparentes, obtenidas del gráfico de dobles recíprocos fueron:  $K_m^{\prime} = 0.576 \mu\text{M}$  y  $V_{\text{max}} = 8.417 \text{ nmol/h/1} \times 10^6 \text{ células}$ , para el caso de la enzima no estimulada con hCG, mientras que en la reacción estimulada los valores fueron  $K_m^{\prime} = 0.25 \mu\text{M}$  y  $V_{\text{max}} = 8.85 \text{ nmol/h/1} \times 10^6 \text{ células}$ .

Sin embargo, no se demuestra que esta capacidad pueda manifestarse in vivo. No obstante, la respuesta de las células ováricas a las gonadotropinas, apoya la hipótesis de que los esteroides sintetizados in vitro, puedan también, ser sintetizados in vivo.

La observación de que tanto la 5 $\alpha$ -androsterona como la 5 $\alpha$ -androstandiona fueron producidas en grandes cantidades, sugiere para estos compuestos, un posible papel fisiológico, ya sea directamente o a través de disminuir la concentración de un metabolito activo.

Aunque no ha sido dilucidado el papel de los estrógenos en el ovario prefolicular, se ha propuesto que estos puedan tener un papel local en la diferenciación gonadal. Byskov ha sugerido que los estrógenos retardan el inicio de la meiosis (55,56). En su modelo, ella propone que la diferenciación ovárica puede mostrar dos diferentes patrones, dependiendo de si las células germinales del ovario sufren meiosis inmediata, sin previa producción de esteroides, o meiosis retardada, con secreción tanto de esteroides como de la sustancia que evita la meiosis (meiosis-preventing substance, MPS).

En las especies con meiosis inmediata (e.g., ratón, rata, hamster), las células germinales del ovario entran en la primera profase meiótica simultáneamente con, o, poco después de que el ovario gonadal puede ser reconocido morfológicamente. Estos ovarios sintetizan esteroides limitadamente hasta que se forman los folículos (57,58).

En las especies con meiosis retardada (e.g., cerdo, oveja, perro, bovino, gato), el inicio de la meiosis en la hembra se retarda hasta 45 días (en la vaca) después de que ha ocurrido la diferenciación ovárica i.e., periodo de retardo. En contraste a las especies con meiosis inmediata, estos ovarios producen mayores cantidades de esteroides durante el periodo de retardo. El ovario fetal humano representa un ejemplo transitorio entre la meiosis inmediata y retardada. Aunque hay un periodo de retardo de 2 a 3 semanas, hay producción limitada de esteroides.

La hipótesis de que los estrógenos actúen localmente implica que en las células ováricas existan receptores específicos para este tipo de hormonas, lo cual aún no ha sido demostrado en el ovario prefolicular.

No obstante, en estadios posteriores de desarrollo si se ha obtenido evidencia experimental, ya que se ha observado in vivo la captación y retención específica del <sup>3</sup>H-estradiol por los ovarios de ratas inmaduras, así como la unión del estradiol a la fracción nuclear de las células de la granulosa y células lúteas, indicando la presencia de sitios de unión a estrógenos, similares a los receptores específicos de estrógenos del tejido uterino (59-61).

Por otra parte, se ha sugerido que las células esteroidogénicas derivan de la médula ovárica (40,62), una hipótesis que concuerda parcialmente con nuestros resultados, donde la mayor secreción de testosterona y 17 $\beta$ -estradiol fue observada en la región medular del ovario del



pollo recién nacido, mientras que en esa misma región, en el ovario del feto de bovino, se observó actividad de aromatasa, de  $3\beta$ -HSD y de  $17\beta$ -HSD. Sin embargo, como también se observó actividad esteroidogénica en las células derivadas de la corteza ovárica de ambas especies, no se descarta la participación de esta región en la contribución de las células esteroidogénicas.

Con base en los resultados obtenidos, puede concluirse que en la esteroidogénesis por el ovario prefolicular, participan diferentes poblaciones celulares con capacidades esteroidogénicas distintas, lo cual representa una evidencia de cooperación celular en la síntesis de esteroides por el ovario en desarrollo.

El poder identificar y caracterizar a las diferentes subpoblaciones de células esteroidogénicas, puede proporcionar una herramienta para estudiar los factores que participan en la regulación de la expresión endócrina del ovario prefolicular y su significado fisiológico.

## PERSPECTIVAS

De los resultados precedentes podemos distinguir varias líneas de investigación con las que se puede continuar el trabajo realizado:

- 1.- La técnica de gradientes de densidad ha sido apropiada para separar células esteroideogénicas del ovario y del testículo (63,64). Mediante este procedimiento, en el ovario prefollicular del pollo se ha demostrado la existencia de dos subpoblaciones de células esteroideogénicas. Sin embargo, queda por definir el número de estas poblaciones, ya que las células colectadas de las fracciones III, IV, V y VI, mostraron diferente comportamiento esteroideogénico. Para resolver esta pregunta, se podría realizar un segundo paso de purificación, ya sea ampliando el gradiente o utilizando otros reactivos para formar un segundo gradiente de densidad. Una vez aisladas, se podría definir que capacidades enzimáticas poseen y establecer de que manera cooperan en la síntesis de esteroides.
- 2.- Las células de la fracción II del gradiente de densidad, secretaron a la testosterona, lo que indicaría que la enzima C17-C20 liasa se encuentra en estas células. De igual manera, como en estas células se observó la síntesis de androstenediona, esto sugiere

la presencia de la enzima  $17\beta$ -HSD. Es probable que la estimulación de estas células con hCG pueda ofrecer un modelo para estudiar la regulación de la expresión genética de las enzimas anteriormente mencionadas. Además, falta por determinar la presencia de otras enzimas de las vías de esteroidogénesis, tales como la C20-C22 liasa.

- 3.- Se ha reportado que los factores de crecimiento pueden afectar la síntesis de estrógenos en las células de la granulosa (85). Como en el feto de bovino se observó una actividad esteroidogénica transitoria (34), podría ser utilizado como modelo para estudiar los factores que modifican la expresión genética de las enzimas reguladoras de la esteroidogénesis (e.g.,  $3\beta$ -HSD, C17-C20 liasa,  $17\beta$ -HSD, aromatasa).
- 4.- Algunos autores han mostrado que en las células de la granulosa de ovario de rata, existen diferencias en los receptores de membrana para FSH y el VIP (28,29). Nuestros resultados mostraron que las células derivadas del ovario del pollo respondieron de manera diferente, a la estimulación por hCG. Además, se ha reportado que la bLH estimula en el ovario fetal del bovino, la secreción de  $17\beta$ -estradiol (34). Sin embargo, no se ha demostrado en el pollo y en el bovino, la presencia de

receptores a gonadotropinas, lo cual podría ser evaluado, realizando la técnica de unión a ligando.

- 5.- En la médula ovárica del pollo recién nacido, las células relativamente indiferenciadas son las más abundantes, aunque también están presentes las células esteroidogénicas típicas (42). La relación anatómica entre ambos tipos de células, puede indicar que cooperan en la producción de esteroides, o que representen diferentes grados de maduración celular. El cultivo de estos tipos de células, puede ofrecer un modelo para estudiar los factores que participan en la diferenciación celular de las células esteroidogénicas.
- 6.- La función fisiológica de la secreción de estrógenos por el ovario prefollicular no ha sido aclarada. Sin embargo, se le ha asignado un papel local en la diferenciación de la gónada, así como en el retardo del inicio de la meiosis (39,55). En ambos casos, para que los estrógenos puedan ejercer su efecto, deben estar presentes sus receptores en los tejidos blanco, lo cual no ha sido demostrado. Utilizando la técnica de unión a ligando, se podría demostrar que tipo de células ováricas poseen estos receptores. Una vez establecida su presencia, se podrían estudiar los efectos hormonales en las células blanco, así como los factores que determinan la expresión de estos receptores.

- 7.- Aunque se ha demostrado que el ovario prefolioular del bovino sintetiza esteroides, no se ha establecido el inicio de la actividad esteroidogénica en este tejido. Para responder a esta pregunta, se podría estudiar el metabolismo de la androstenediona tritiada, por las gónadas indiferenciadas morfológicamente, pero determinando el sexo genotípico. La síntesis de estrona o estradiol podrían ser indicadores de la diferenciación bioquímica del ovario.
- 8.- Se ha propuesto que las células esteroidogénicas derivan de la médula ovárica (40,62). Nuestros resultados muestran que tanto la corteza como la médula ovárica, poseen capacidad de síntesis de esteroides. Si se contara con marcadores de las células esteroidogénicas, específicos y sensibles, podría establecerse el origen de estas células.

#### REFERENCIAS GENERALES

1. Margulis, L., Sagan, D., Olendzenski, L.; What is the sex?. In: THE ORIGIN AND EVOLUTION OF SEX. Edited by H.O. Halvorson, A. Monroy. Alan R. Liss Inc., New York, 1985. pp. 69-85.
2. Moriya, S., Tanaka, T., Okada, Y., Kikuchi, T., Fujimoto, S., Ichinoe, K.; Influence of the oocyte upon proliferation, differentiation and steroidogenesis of cultured granulosa cells. In: PRESERVATION OF TUBO-OVARIAN FUNCTION IN GYNECOLOGIC BENIGN AND MALIGNANT DISEASE. SERONO SYMPOSIA PUBL., Vol. 4B. Raven Press, New York, 1988. pp. 148-161.
3. Wallach, E.E., Atlas, S.J., Dharmarajan, A.M., Oski, J.A., Santulli, R.; The periovulatory interval: physiologic and endocrinologic implications. In: DEVELOPMENT OF PREIMPLANTATION EMBRYOS AND THEIR ENVIRONMENT. Alan R. Liss, Inc., New York, 1989. pp. 87-100.
4. Kurakawa, T., Karachi, K., Aono, T., Matsumoto, K.; Formation of 5 $\alpha$ -reduced C<sub>19</sub>-steroids from progesterone in vitro by a pathway through 5 $\alpha$ -reduced C<sub>17</sub>-steroids in ovaries of late prepubertal rats. Endocrinology 88: 571-579, 1976.
5. Marrone, B.L., Hertelendy, F.; Steroid metabolism by avian ovarian cells during follicular maturation. Biol. Reprod. 29: 953-962, 1983.
6. Doyal, E.A., Velez, C.D., Thayer, S.; Folliculin from urine of pregnant women. Am. J. Physiol. 90: 329-330, 1929.
7. Dehennin, L., Blacker, C., Reiffsteck, A., Scholler, R.; Estrogen 2-, 4-, 6- or 16-hydroxylation by human follicles shown by gas chromatography-mass spectrometry associated with stable isotope dilution. J. Steroid Biochem. 20: 465-471, 1984.
8. Silverzhan, P., Dehennin, L., Zwain, J., Reiffsteck, A.; Gas chromatography-mass spectrometry of androgens in equine ovarian follicles at ultrastructurally defined stages of development. Identification of 19-nortestosterone in follicular fluid. Endocrinology 117: 2176-2181, 1985.
9. Khalil, M.W., Walton, J.S.; Identification and measurement of 4-oestren-3,17-dione (19-norandrostenedione) in porcine ovarian follicular fluid using high performance liquid chromatography and capillary gas chromatography-mass spectrometry. J. Endocrinol. 107: 375-381, 1985.
10. Juárez Oropesa, M.A. y Quiróz Martínez, A.; Las lipoproteínas. En: BIOQUIMICA E INMUNOLOGIA, Vol. 2. J.C. Díaz Zagoya y J.J. Hicks (Eds). Pub. UNAM, 1988. Cap. 16. pp. 311-338.
11. Dolphin, P.J.; Lipoprotein metabolism and the role of apoproteins as metabolic programmers. Can. J. Biochem. Cell. Biol. 63: 850-855, 1985.
12. McLean, M.P., Derick, R.J., Miller, J.B.; The effect of human chorionic gonadotropin, dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, prostaglandins, and 25-hydroxycholesterol on acute progesterone secretion by dissociated rabbit luteal cells in vitro: evidence for independent effects of human chorionic gonadotropins and lipoproteins. Biol. Reprod. 38: 854-863, 1987.

13. Juárez Oropeza, M.A.; Colesterol: de la biología celular a la biología molecular. En: MENSAJE BIOQUÍMICO, Vol. 11. M.A. Vázquez Alcántara, J. Ponce Frausto y M.E. Salinas y Mejía (Eds). Pub. UNAM, 1988. pp. 79-128.
14. Russell, D.W., Lehrman, M.A., Sudhof, T.C., Yamamoto, T., Davis, C.G., Hobbs, H.H., Brown, M.S., Goldstein, J.L.; The LDL receptor in familial hypercholesterolemia: use of human mutations to dissect a membrane protein. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 611-619, 1986.
15. Warren, G., Woodman, P., Pypaert, M., Smythe, E.; Cell-free assays and the mechanism of receptor-mediated endocytosis. TIBS. 13: 462-465, 1988.
16. Schneider, W.J.; The low density lipoprotein receptor. Biochim. Biophys. Acta. 986: 303-317, 1989.
17. Bruot, B.C., Vliest, W.G., Collins, D.C.; Effect of low density and high density lipoprotein on progesterone secretion by dispersed corpora luteal cells from rats treated with aminopyrazolo(3,4-d)pyrimidine. Endocrinology. 110: 1572-1576, 1982.
18. Carr, B.R., Sadler, R.K., Rochell, D.B., Stalmach, M.A., MacDonald, P.C., Simpson, E.R.; Plasma lipoprotein regulation of progesterone biosynthesis by human corpus luteum tissue in organ culture. J. Clin. Endocrinol. Metab. 52: 875-881, 1981.
19. Juárez Oropeza, M.A. y Díaz Zagoya, J.C.; Enzimas clave en el metabolismo del colesterol y su regulación. Boletín de Educación Bioquímica. 4(1): 8-20, 1985.
20. Luskey, K.L.; Regulation of cholesterol synthesis: mechanism for control of HMG-CoA reductase. Recent. Prog. Hormon. Res. 44: 35-51, 1988.
21. Brown, M.S., Goldstein, J.L.; The LDL receptor and HMG-CoA reductase -Two membrane molecules that regulate cholesterol homeostasis. Curr. Top. Cell. Regul. 26: 3-15, 1985.
22. The, V.L., Labrie, C., Zhao, H.F., Couet, J., Lachance, Y., Seward, J., Leblanc, G., Coté, J., Barubé, D., Gagné, R., Labrie, F.; Characterization of cDNAs for human estradiol 17 $\beta$ -dehydrogenase and assignment of the gene to chromosome 17: evidence of two mRNA species with distinct 5'-termini in human placenta. Mol. Endocr. 3: 1301-1309, 1989.
23. Díaz-Zagoya, J.C., Vliest, W.G., Arias, F.; 20 $\alpha$ -hydroxysteroid oxidoreductase activity and 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone concentration in human placenta before and after parturition. Am. J. Obstet. Gynecol. 133: 673-678, 1979.
24. Gore-Langton, R.E., Armstrong, D.T.; Follicular steroidogenesis and its control. In: PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION, Vol. 1. Edited by E. Knobil, J.D. Neill, L.L. Ewing, G.S. Greenwald, C.L. Markert, D.W. Pfaff. Raven Press, Ltd. New York, 1988. Chapter 10. pp. 331-385.
25. Byskov, A.G.; Differentiation of mammalian embryonic gonad. Phys. Rev. 68: 71-117, 1988.

26. Byskov, A.G., Hoyer, P.E.; Embryology of mammalian gonads and ducts. In: **PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION**, Vol. 1. Edited by E. Knobil, J.D. Neill, L.L. Ewing, G.S. Greenwald, C.L. Markert, D.W. Pfaff. Raven Press, Ltd. New York, 1988. Chapter 6. pp. 265-302.
27. Falck, B.; Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.* 47(163): 1-101, 1959.
28. Kasson, B.G., Median, R., Davoren, J.B., Heuch, A.J.W.; Identification of subpopulations of rat granulosa cells: sedimentation properties and hormonal responsiveness. *Endocrinology*. 117: 1027-1034, 1985.
29. Erickson, G.F., Hofeditz, C., Unger, M., Allen, W.R., Dulbecco, R.; A monoclonal antibody to a marmoset cell line recognizes two distinct subtypes of ovarian granulosa cells. *Endocrinology*. 117: 1490-1499, 1985.
30. Veniger, J.P., Chouraqi, J., Zeis, A.; Conversion of testosterone and progesterone to oestrone by the ovary of the rat embryo in organ culture. *J. Steroid Biochem.* 21: 347-349, 1984.
31. Picon, R., Pelloux, M.C., Benhaim, A., Gloaguen, F.; Conversion of androgen to estrogen by the rat fetal and neonatal female gonad: effects of dcAMP and FSH. *J. Steroid Biochem.* 23: 995-1000, 1985.
32. Terada, N., Kuroda, H., Namiki, M., Kitamura, Y., Matsumoto, K.; Augmentation of aromatase activity by FSH in ovaries of fetal and neonatal mice in organ culture. *J. Steroid Biochem.* 20: 741-745, 1984.
33. Imataka, H., Suzuki, K., Inano, M., Kohmoto, K., Tamaki, B.I.; Developmental changes of steroidogenic enzyme activities in the embryonic gonads of the chicken: the sexual difference. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 413-418, 1986.
34. Shemesh, M.; Estradiol-17 $\beta$  biosynthesis by the early bovine fetal ovary during the active and refractory phases. *Biol. Reprod.* 23: 577-582, 1980.
35. Shemesh, M., Allenberg, M., Milaguir, F., Ayalón, N., Hansel, W.; Hormone secretion by cultured bovine pre- and postimplantation gonads. *Biol. Reprod.* 19: 761-767, 1978.
36. Alvarez Fernández, G.; Estudio de la esteroidogénesis en el ovario fetal de bovino. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. 1969.
37. Pedernera, E., Juárez-Oropeza, M.A., Alvarez-Fernández, G., Kawa, S.; Regional distribution of steroid biosynthesis in the fetal bovine ovary. The Endocrine Society 70th Annual Meeting. New Orleans, Louisiana, 1988. p. 193.
38. Roberts, J.D., Warren, J.C.; Steroid biosynthesis in the fetal ovary. *Endocrinology*. 74: 848-852, 1984.
39. George, F.V., Wilson, J.D.; Sex determination and differentiation. In: **PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION**, Vol. 1. Edited by E. Knobil, J.D. Neill, L.L. Ewing, G.S. Greenwald, C.L. Markert, D.W. Pfaff. Raven Press, Ltd. New York, 1988. Chapter 1. pp. 3-26.



40. Narbaitz, R., Adler, R.; Submicroscopical observation on the differentiation of chick gonads. *J. Embryol. exp. Morph.* 16: 41-47, 1966.
41. Jordanov, J., Angelova, P., Boyadjieva-Michailova, A., Bakalska, M.; Ultrastructure of developing interstitial cells in chick embryonic gonad in relation to their genesis and steroidogenic function. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 92: 449-464, 1976.
42. González-Morán, G., González del Pliego, M., Pedernera, E.; Morphological changes in the ovary of the newly hatched chickens treated with chorionic gonadotropin during embryonic development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 59: 162-167, 1985.
43. George, F.W., Wilson, J.D.; Conversion of androgen to estrogen by the human fetal ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47: 550-555, 1976.
44. Milewich, L., George, F.W., Wilson, J.D.; Estrogen formation by the ovary of the rabbit embryo. *Endocrinology.* 100: 187-196, 1977.
45. Porter, T.E., Hargis, B.M., Sliaby, J.L., El-Halawani, M.; Differential steroid production between theca interna and theca externa cells: A three-cell model for follicular steroidogenesis in avian species. *Endocrinology.* 125: 109-116, 1969.
46. Pedernera, E., Velázquez, P., Gómez, Y., González del Pliego, M.; Isolation of steroidogenic cell subpopulations in the follicular theca of the ovary in the domestic fowl. In: *GROWTH FACTORS AND THE OVARY*. Edited by A.N. Hirshfield. Plenum Press, New York, 1989. pp. 351-355.
47. Takahashi, H., Duleba, A.J., Yuen, B.H., Moon, Y.S.; Steroidogenic capabilities of various compartments of rat ovarian follicle in culture. *Steroids.* 44: 337-346, 1984.
48. Haulson, P., Bezaud, J., Terqui, M.; Very early and transient 17 $\beta$ -estradiol secretion by fetal sheep ovary, *in vitro* study. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 17: 399-401, 1977.
49. Sholl, S.A., Goy, R.W.; Androgen and estrogen synthesis in the fetal guinea pig gonad. *Biol. Reprod.* 16: 160-169, 1976.
50. Gondos, B., George, F.W., Wilson, J.D.; Granulosa cell differentiation and estrogen synthesis in the fetal rabbit ovary. *Biol. Reprod.* 29: 791-796, 1983.
51. Picon, R., Darmoul, D., Rouffier, V., Duranteau, L.; Activity of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase in the fetal rat ovary. *J. Steroid Biochem.* 31: 839-843, 1988.
52. Galli, F.E., Wassermann, G.F.; Steroid biosynthesis by gonads of 7- and 10-day-old chick embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.* 21: 77-83, 1973.
53. Gulchard, A., Cedard, L., Haffen, K.; Aspect comparatif de la synthèse de stéroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de poulet à différents stades du développement (étude en culture organotypique à partir de précurseur radioactifs). *Gen. Comp. Endocrinol.* 20: 16-26, 1973.

54. Fukuda, S., Terakawa, N., Sato, B., Imori, T., Matsumoto, K.; Hormonal regulation of activities of  $17\beta$ -ol-dehydrogenase, aromatase and 4-ene-5 $\alpha$ -reductase in immature rat ovaries. *J. Steroid Biochem.* 11: 1421-1424, 1979.
55. Byskov, A.G.; Regulation of meiosis in mammals. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 19: 1251-1261, 1979.
56. Tsafiriri, A.; Local Nonsteroidal regulators of ovarian function. In: *PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION*, Vol. 1. Edited by E. Knobil, J.D. Neill, L.L. Ewing, G.S. Greenwald, C.L. Markert, D.W. Pfaff. Raven Press, Ltd. New York, 1988. Chapter 14. pp. 527-585.
57. Roullier, V., Gangnerau, M.N., Picon, R.; Production of  $C_{21}$  steroids in the rat fetal ovaries. *J. Steroid Biochem.* 31: 447-452, 1985.
58. Weniger, J.P., Zeis, A.; Stimulation of aromatase activity in the fetal rat gonads by cAMP and FSH. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 119: 381-385, 1988.
59. Saiduddin, S.;  $^3H$ -estradiol uptake by the rat ovary. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 136: 651-660, 1971.
60. Richards, J.S.; Estradiol receptor content of rat granulosa cells during follicular development; modification by estradiol and gonadotropins. *Endocrinology*. 97: 1174-1184, 1975.
61. Saiduddin, S., Zassenhaus, H.P.; Estradiol- $17\beta$  receptors in the immature rat ovary. *Steroids* 29: 197-213, 1977.
62. Schelb, D., Haffen, K.; Sur la localisation de la  $3\beta$ -HSDH dans les gonades de l'embryon de poulet; apparition et spécificité de l'activité enzymatique. *Annls. Embryol. Morph.* 1: 61-72, 1968.
63. Teng, C.T., Teng, C.S.; Studies on sex organ development: separation and culture of steroid-producing cells from growing and regressing embryonic ovaries. *Endocrinology*. 104: 1337-1343, 1979.
64. Payne A.H., Downing, J.R., Wong, K.L.; Lutalizing hormone receptors and testosterone synthesis in two populations of Leydig cells. *Endocrinology*. 106: 1424-1429, 1980.
65. Steinkampf, M.P., Mendelson, C.R., Simpson, E.R.; Effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the levels of mRNA encoding aromatase cytochrome P-450 of human ovarian granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 59: 93-99, 1988.

## Identification of Steroidogenic Cell Subpopulations in the Ovary of the Newly Hatched Chicken

E. PEDERNERA, Y. GÓMEZ, P. VELÁZQUEZ,\* M. A. JUÁREZ-OROPEZA,† AND M. GONZÁLEZ DEL PLIEGO

*Departamento de Embriología, \*Departamento de Histología, and †Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510*

Accepted February 24, 1988

The aim of the present study is the isolation of subpopulations of steroid-producing cells in the ovary of the newly hatched chicken. Cells were obtained by fractional trypsin dissociation of the ovary and isopycnic separation in a continuous metrizamide gradient (0-30%). Testosterone and 17 $\beta$ -estradiol secretion was measured by radioimmunoassay in the incubation medium of the isolated cells. Six fractions of ovarian cells were studied. Fraction II (density 1.080) contained typical steroidogenic cells with a positive reaction for 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase,  $\Delta^5$ -isomerase. This fraction secreted testosterone (3.7 ng/10<sup>6</sup> cells/2 hr) but no 17 $\beta$ -estradiol secretion was detectable. The majority (85%) of cells obtained in fraction VI (density 1.150) were relatively undifferentiated and contained polyribosomes, mitochondria with lamellar cristae, and few rough endoplasmic reticulum; only 3-5% of the cells of this fraction were similar to those of fraction II. In fraction VI the highest level of 17 $\beta$ -estradiol secretion was found (2.9 ng/10<sup>6</sup> cells/2 hr) whereas testosterone was at a minimum level (0.06 ng/10<sup>6</sup> cells/2 hr). Results strongly suggest the existence of two cell subpopulations in the immature chicken ovary: typical steroidogenic and poorly differentiated cells which secrete testosterone and 17 $\beta$ -estradiol, respectively. © 1988 Academic Press, Inc.

Steroidogenic cells have been described in the ovary of the chick embryo by ultrastructural and immunohistochemical studies (Narbaitz and Adler, 1966; Woods and Podczaski, 1974; Woods and Erton, 1978; Jordanov *et al.*, 1978) confirming previous descriptions of positive cells for 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase,  $\Delta^5$ -isomerase ( $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HSD) (Narbaitz and Kolodny, 1964; Scheib and Haffen, 1967; Woods and Weeks, 1969). Steroid-producing cells are abundant at the end of embryonic development and 18% of the ovarian medulla consist of this cellular type in the newly hatched chicken (González-Morán *et al.*, 1985). Biosynthesis of 17 $\beta$ -estradiol and estrone in the ovary of the chick embryo has been demonstrated at 6-7 days of incubation (Weniger and Zeis, 1971; Galli and Wassermann, 1973;

Guichard *et al.*, 1973). Secretion *in vitro* of 17 $\beta$ -estradiol by the ovary and 17 $\beta$ -estradiol plasma levels have been described from that age onward in the chick embryo (Guichard *et al.*, 1977, 1979; Woods and Brazzill, 1981).

Luteinizing hormone (LH) or human chorionic gonadotropin (hCG) stimulate steroid hormone secretion by the chick embryo ovary; stimulation has been registered *in vivo* and *in vitro* in ovaries obtained from 8- to 18-day-old chick embryos (Teng and Teng, 1977, 1979, 1982; Guichard *et al.*, 1979; Woods *et al.*, 1981).

Density gradients have been previously used to isolate steroidogenic cells in the ovary and the testis (Teng and Teng, 1979; Payne *et al.*, 1980). In the present work, the isopycnic separation of ovarian cells obtained from newly hatched chickens is at-

tempted, and the secretion of  $17\beta$ -estradiol and testosterone of each cellular subpopulation is evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials.** Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) and trypsin were obtained from Grand Island Biological Co. (Grand Island, NY); soybean trypsin inhibitor, bovine serum albumine (BSA), 1-methyl 3-isobutyl xanthine (IBMX), metrizamide, human chorionic gonadotropin (hCG), testosterone,  $\Delta_4$ -androsten-3,17-dione, androsterone,  $5\alpha$ -dihydrotestosterone, dehydroepiandrosterone, estrone, and  $17\beta$ -estradiol were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Shepadex LH-20 was obtained from Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden). Anti-testosterone and anti- $17\beta$ -estradiol sera were products from Radioassay Inc. (Carson, CA);  $[1,2,6,7,^3\text{H}]$ testosterone (94 Ci/mmol) and  $17\beta$ - $[2,4,6,7,^3\text{H}]$ estradiol (92 Ci/mmol) were purchased from Amersham International (Buckinghamshire, England);  $[7\text{-}^3\text{H}]$ testosterone (29 Ci/mmol) was obtained from New England Nuclear (Boston, MA). Thin-layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 F254-coated aluminium sheets (Merck, Mexico).

**Animals.** Newly hatched chickens, White Leghorn (Hatchcock B300) and Rhode Island (Welpine), were obtained from local hatcheries and studied within 24 hr after hatching.

**Ovarian cell preparations.** Left ovaries were dissected and incubated in 0.25% trypsin in balanced salt solution ( $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  free) at  $37^\circ$  in a shaking bath (90 cycles/min). Ovarian cells recovered after 10, 20, and 30 min of incubation were treated with 0.5% soybean trypsin inhibitor followed by two changes of medium, DMEM with 0.1% of BSA.

Dissociated ovarian cells obtained after 30 min of trypsin incubation were applied to a continuous metrizamide gradient (0–30%),  $30\text{--}50 \times 10^6$  cells were laid on 5 ml of gradient, after centrifugation at  $4000g$  for 7 min, and 0.3-ml fractions were collected from the top of the tube. Fractions containing ovarian cells were washed with 10 ml of incubation medium. The final cell number was counted with the aid of a hemocytometer, and viability was established by the trypan blue exclusion test (Tennant, 1964).

**Estradiol and testosterone secretion.** Samples of the ovarian cell suspensions ( $10^6$  cells) were incubated in 1 ml of DMEM with 0.1% of BSA and 0.1 mM of IBMX. The incubation was performed at  $37^\circ$  in a shaking bath (90 cycles/min) under 5%  $\text{CO}_2$  and 95% air. Unless otherwise indicated the incubation time was 120 min. In order to stimulate steroid hormone secretion, hCG (1.0 IU/ml) was added to the incubation medium of some ovarian cell samples. Aliquots (50  $\mu\text{l}$ ) of the medium

were collected; estradiol and testosterone were directly measured by specific radioimmunoassays that were previously validated (Pedernera and Gomar, 1984).

**Morphological studies.** For ultrastructural studies, samples of ovarian cell fractions and fragments of trypsinated ovaries were fixed in 2% glutaraldehyde in 0.15 M phosphate buffer, pH 7.4, postfixed in 1% osmium tetroxide and embedded in plastic resins. Gray to pale gold sections were obtained in a Reichert ultramicrotome and stained with uranyl acetate followed by lead citrate (Reynolds, 1963). Sections were observed in a EM9-S2 Zeiss electron microscope. For light microscopy observations, sections of 1  $\mu\text{m}$  thick were stained with toluidine blue. In some experiments, the percentage of cells that were positive for  $\Delta^5$ - $3\beta$ -HSD (Payne *et al.*, 1980) was counted employing a hemocytometer, in every fraction of ovarian cells.

**Testosterone metabolism.** Radiolabeled testosterone ( $7\text{-}^3\text{H}$ ) was used to know the steroidogenic capabilities of each ovarian cell fraction. With this purpose, cell samples were incubated with 0.5  $\mu\text{Ci}$  of  $[7\text{-}^3\text{H}]$ testosterone as mentioned before. In all cases, cells were stimulated by hCG (1.0 IU/ml) administration. Incubation was stopped by 10 vol of cold diethyl ether addition. Cells were extracted three times with 10 vol of diethyl ether. Extracts were evaporated under nitrogen stream at  $37^\circ$  and reconstituted in absolute ethanol. Extracts containing radiolabeled steroids were supplemented with the following steroids (0.5–1.0  $\mu\text{g}$  each per sample) serving as internal standards: testosterone,  $\Delta_4$ -androsten-3,17-dione, androsterone, dehydroepiandrosterone,  $5\alpha$ -dihydrotestosterone,  $17\beta$ -estradiol, and estrone. The steroids were separated by thin-layer chromatography developed with methylene chloride:ethyl acetate, 80:20 (v/v), or in Sephadex LH-20 column (0.5 g,  $0.5 \times 6.5$  cm) eluted with benzene:methanol, 9:1 (v/v), followed by a second thin-layer chromatography developed with hexane:diethyl ether, 3:1 (v/v). The detection of standard steroids was made by uv absorption and by visualization after charring at  $120^\circ$  for 15 min with sulfuric acid-water, 1:1 (v/v).

Regions corresponding to authentic standards were scrapped into scintillation vials and subsequently evaluated for radioactivity in a Packard Tri-Carb 3255 liquid scintillation spectrometer.

Final identification of radioactive metabolites was achieved by the copurification with authentic standards; the agreement of results obtained by the three chromatographic procedures was taken as evidence for identification of the steroids.

## RESULTS

Ovarian cells obtained after enzymatic dissociation were classified into three

types: (a) oocytes, cells with a diameter of 25  $\mu\text{m}$  or more, (b) cells with lipid droplets in the cytoplasm (diameter 15–25  $\mu\text{m}$ ), and (c) cells without lipid droplets (diameter 5–25  $\mu\text{m}$ ). The proportion of each cellular type changed in the fractions obtained at 10, 20, and 30 min of trypsin incubation (Table 1). Oocytes were mainly recovered in the 10-min fraction and reduced to 2.7% of the cells in the 30-min fraction. On the other hand, cells with lipid droplets were incremented in the 30-min fraction. Light microscopy observations confirmed that the cortex of the ovary was dissociated during the first minutes of trypsin incubation and was practically disaggregated after 20 min of treatment.

The study of the steroid-hormone secretion by the ovarian cells which were collected during the fractional trypsinization demonstrated that the highest 17 $\beta$ -estradiol levels were obtained in the 30-min fraction (Fig. 1). In the following experiments, only ovarian cells obtained in the fraction of 30 min were employed.

The response of the dissociated ovarian cells to several doses of hCG was evaluated by measuring the 17 $\beta$ -estradiol and testosterone secretion (Fig. 2). The ED<sub>50</sub> for hCG was 0.25 and 0.64 IU/ml by measuring 17 $\beta$ -estradiol and testosterone, respectively. Time-course response to the same hormone was also registered (Fig. 3). Results evidenced an increase in 17 $\beta$ -estradiol secretion, at least during 8 hr, under the incubation conditions.

When isolated ovarian cells were submitted to isopycnic separation, the type of

TABLE I  
PERCENTAGE OF CELLULAR TYPES OBTAINED AT SEVERAL TRYPSIN INCUBATIONS

Time (min)	With lipids	Without lipids	Oocytes
10	1.2 $\pm$ 0.7	77.4 $\pm$ 2.8	21.3 $\pm$ 3.4
20	8.2 $\pm$ 2.3	86.5 $\pm$ 2.3	5.2 $\pm$ 1.4
30	14.2 $\pm$ 0.8	83.0 $\pm$ 0.6	2.7 $\pm$ 0.2

Note. Values are expressed as means  $\pm$  SD.

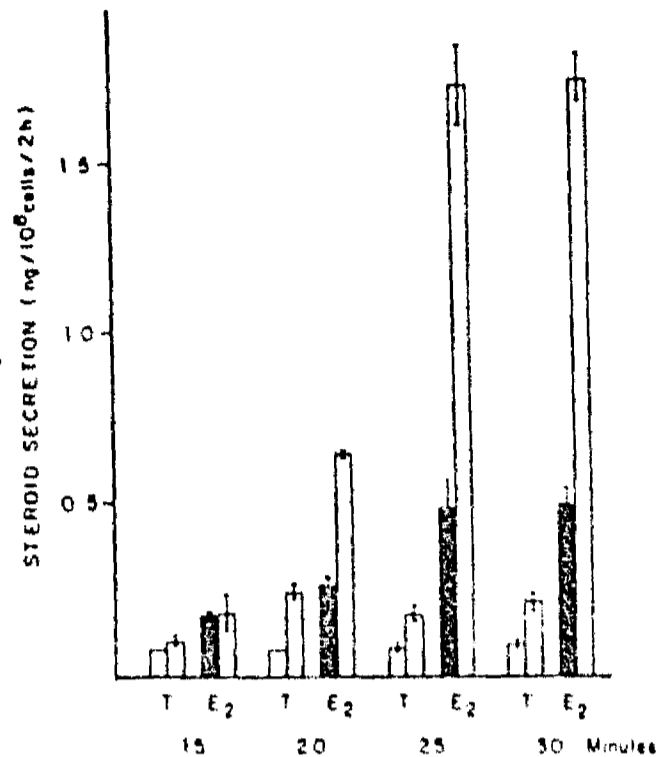


FIG. 1. Testosterone (T) and 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) secretion in ovarian cells obtained from newly hatched chickens (White Leghorn). Cells were isolated after several trypsin treatments. Quantifications were performed under basal ( $\square, \boxplus$ ) and hCG (1.0 IU/ml) stimulated ( $\blacksquare, \boxtimes$ ) *in vitro* conditions. Values represent means  $\pm$  SD.

cells obtained at each fraction was different (Fig. 4). Fraction II (density 1.080) contained a pure population of cells with lipids droplets. While in fraction VI (density 1.150), cells without lipid droplets predom-

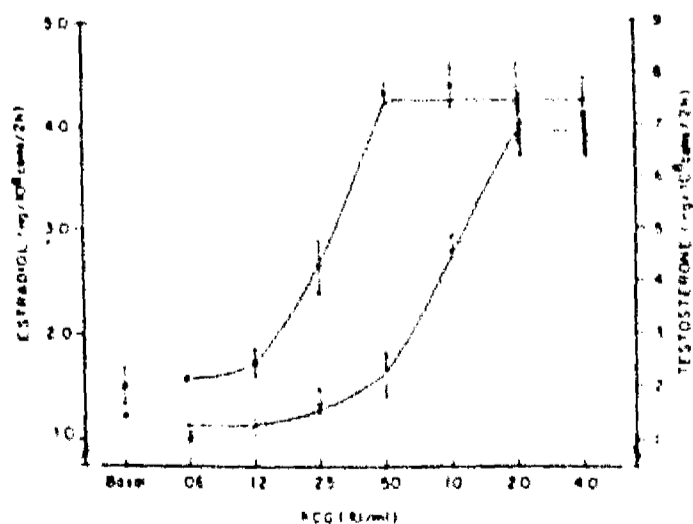


FIG. 2. Dose-response curve to the hCG stimulation in isolated cells from the ovary of White Leghorn newly hatched chicken. Estradiol (O) and testosterone ( $\Delta$ ) secretion was registered. Values represent means  $\pm$  SD.

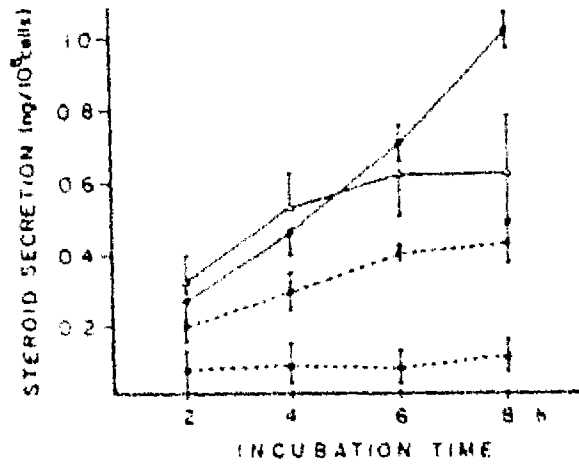


FIG. 3. Time-course response of isolated ovarian cells incubated under basal (●,▲) and hCG (1.0 IU/ml) stimulated (○,△) conditions. Testosterone (△) and 17β-estradiol (○) were measured by RIA in the medium. Cells were obtained from Rhode Island chickens. Values represent means  $\pm$  SD.

inated and only 3% of the cells contained lipid droplets in the cytoplasm. Oocytes were distributed in fractions III, IV, and V. No significant differences in the cell type distribution were observed between the ovaries obtained from White Leghorn or Rhode Island chickens.

The study of ovarian cells which were positive for  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HSD showed that the highest percentage of positive cells were located at fraction II (Fig. 5), the fraction that

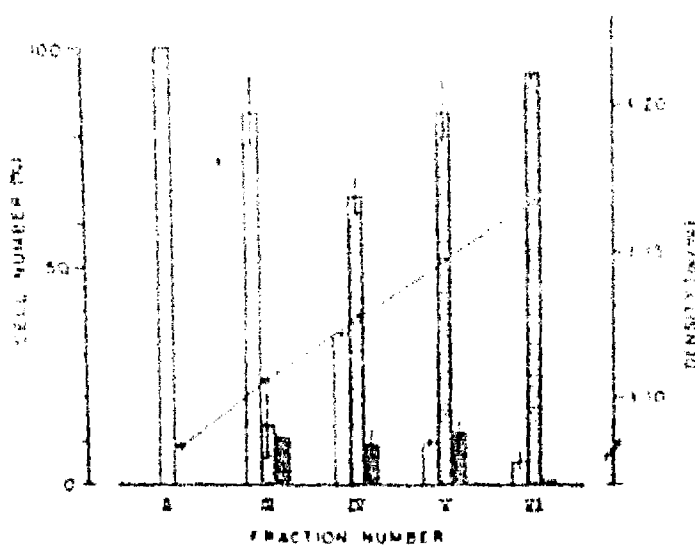


FIG. 4. Percentage of ovarian cell types obtained in fractions of a linear density gradient (○—○). Fractions were numbered from II to VI. Cells were classified into three types: with lipids (□), without lipids (▨), and germinal cells (■). Cells were obtained from White Leghorn chickens. Values represent means  $\pm$  SD.

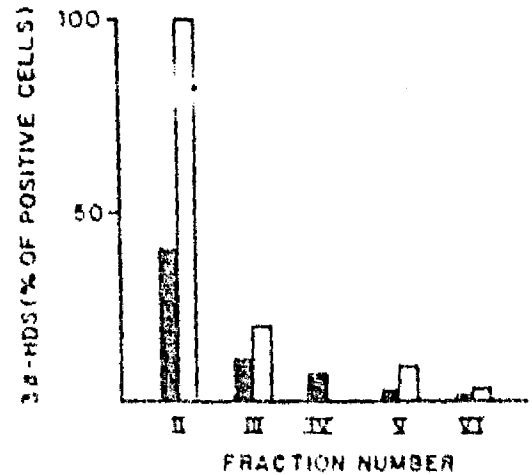


FIG. 5. Percentage of positive cells for  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HSD in fractions of ovarian cells obtained from the density gradient. Cells were obtained from White Leghorn chickens. Two incubation times with the substrate (1 hr ▨ and 2 hr □) were registered.

is formed by cells with lipid droplets. The percentage of positive cells for  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -HSD decreased in other fractions and the lowest values were observed in fraction VI.

In ultrastructural observations, cells obtained from fraction II displayed abundant vesicles of smooth endoplasmic reticulum (SRE), mitochondria with convoluted cristae, and lipid droplets in the cytoplasm (Fig. 6). In fraction VI, more than 85% of the cells were characterized by a scarce cytoplasm with polyribosomes, a few rough endoplasmic reticulum (RER), and mitochondria with lamellar cristae (Fig. 6). Another cell type that exhibited "lining bodies" in the plasmalemma was observed in a low percentage (1-2%) (Fig. 6). In this fraction, cells similar to those observed in fraction II were found at 3-5%. Fibroblasts identified by the cytoplasmic processes and the nuclear feature (Laws *et al.*, 1985) were found in fraction VI, but represented less than 10% of the cells.

The secretion of 17β-estradiol and testosterone by fractions of isolated ovarian cells after isopycnic separation was measured (Fig. 7). The secretion of testosterone was maximum and no 17β-estradiol secretion was detectable in the fraction II of ovarian cells. On the other hand, the highest secretion of 17β-estradiol was registered in frac-



Fig. 1. Electron micrographs of steroidogenic cells in chick ovary. A: A cell with a nucleus and granules. B: A cell with a nucleus (M), granules (L), and SER (smooth endoplasmic reticulum). C: A cell with a nucleus and granules. D: A cell with a nucleus and granules.

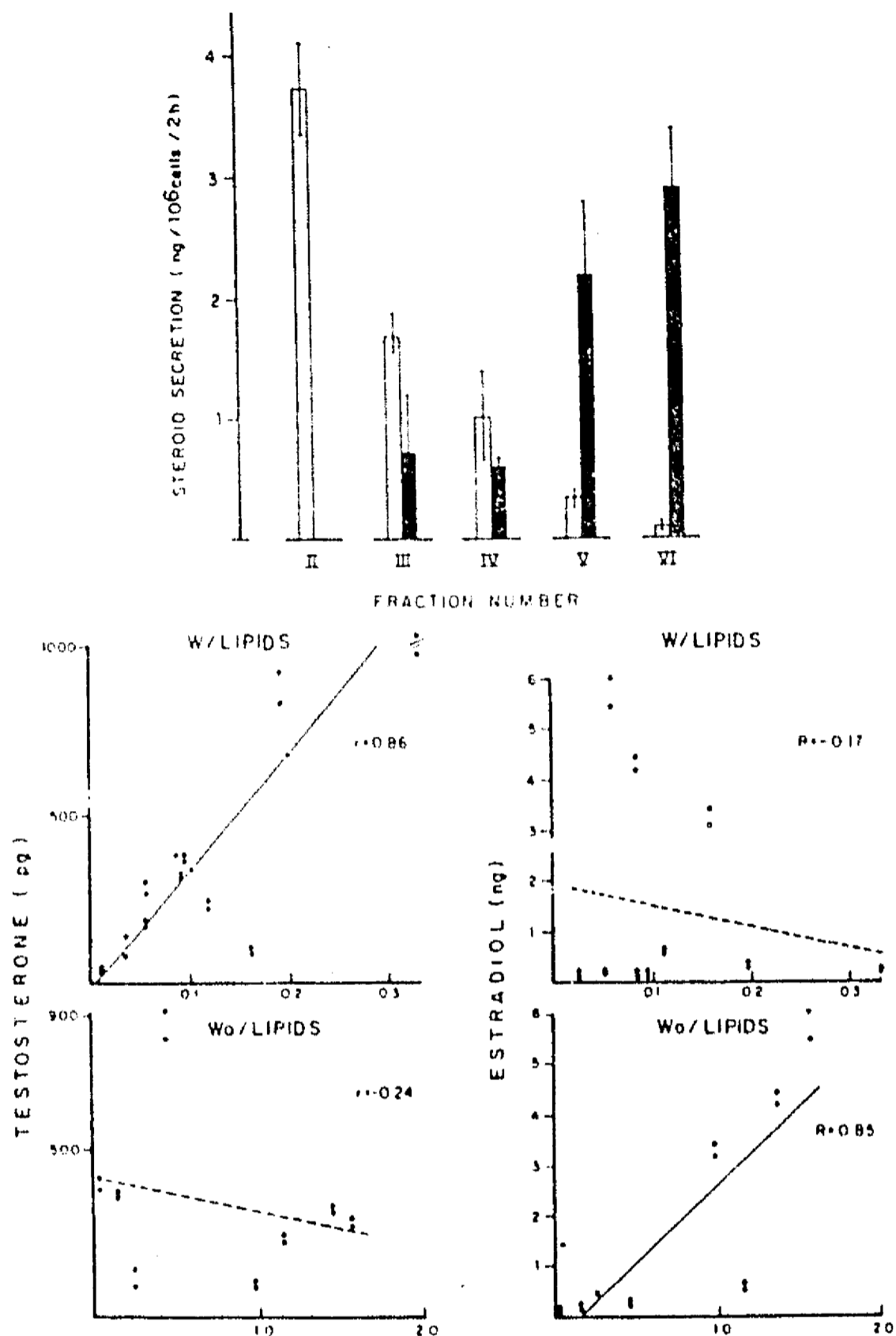


FIG. 7. Secretion of 17 $\beta$ -estradiol ( $\square$ ) and testosterone ( $\blacksquare$ ) in ovarian cells obtained from fractions of the density gradient. Cells were obtained from newly hatched chickens (White Leghorn) and incubated under basal *in vitro* conditions. Values represent means  $\pm$  SD. At the lower part, results are expressed as a correlation between the number of cells ( $10^6$ ) with or without lipid droplets and the 17 $\beta$ -estradiol and testosterone secretion.

tion VI. In the same figure, results were expressed as a correlation between the number of ovarian cells with or without lipids in the cytoplasm and the amount of

17 $\beta$ -estradiol and testosterone secreted. A positive correlation was observed between testosterone secretion and cells with lipids, while 17 $\beta$ -estradiol secretion was corre-



of Rhode Island chickens. The relationship between cellular subpopulations and testosterone secretion was similar in both lines. However, the  $17\beta$ -estradiol secretion in White Leghorns was 10-fold higher than in Rhode Island chickens. Consequently, a reduction in the aromatase activity in the ovary of the Rhode Island chickens could be postulated.

Results obtained after incubation with labeled testosterone and chromatography titration are in agreement with those obtained by radioimmunoassay measurements. However, unidentified steroids were found in fractions distinct from those that secrete androgens and estrogens, suggesting the presence of more than two populations involved in steroid metabolism. The analysis of this event deserves further investigation.

In the adult mammalian ovary, the participation of two cellular types in the secretion of androgens and estrogens has been suggested (Falk, 1959; Short, 1962; Bjersing, 1967). Theca cells secrete androgens, whereas granulosa cells convert androgens to estrogens (Dorrington *et al.*, 1975; Fortone and Armstrong, 1977). In the avian ovary, the secretion of estradiol and testosterone is located in the theca of maturing follicles (Huang and Nalbandov, 1979; Maréchal and Hertelendy, 1983). At hatching, primordial follicles are still not formed in the chicken ovary; however, precursors of theca cells are located in the ovarian medulla (Narbaitz and De Robertis, 1968). Present results indicate that two cellular populations are involved in  $17\beta$ -estradiol and testosterone secretion in the ovary of a newly hatched chicken. Therefore, a cooperation between two cellular types in steroid secretion is observable during the development of the chicken ovary.

#### ACKNOWLEDGMENT

This work was supported in part by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PCNA-050284).

#### REFERENCES

- Bjersing, L. (1967). On the morphology and endocrine function of granulosa cells in ovarian follicles and corpora lutea. *Acta Endocrinol. (Suppl.)* 125, 1-23.
- Carlson, N., and Erickson, G. F. (1978). Fine structure of pre-follicular and developing germ-cells in male and female left embryonic gonads *in vitro* with and without androgenic steroids. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 18, 335-349.
- Dorrington, J. H., Moon, Y. S., and Armstrong, D. T. (1975). Estradiol- $17\beta$  biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats: Stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 97, 1328-1331.
- Falk, B. (1959). Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in microtransplants. *Acta Physiologica Scand. (Suppl.)* 47, 1-100.
- Fortone, J. E., and Armstrong, D. T. (1977). Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrous follicles. *Endocrinology* 100, 1341-1347.
- Galli, F. E., and Wassermann, G. E. (1973). Steroid biosynthesis by gonads of 7- and 10-day-old chick embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.* 21, 77-83.
- González del Pliego, M., González Morán, G., and Pedernera, E. (1988). Ultrastructure of the ovarian medulla in the newly hatched chick treated with human chorionic gonadotropin. *Cell Tiss. Res.* in press.
- González Morán, G., González del Pliego, M., and Pedernera, E. (1985). Morphological changes in the ovary of newly hatched chickens treated with chorionic gonadotropin during embryonic development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 59, 162-167.
- Guichard, A., Cedard, L., and Haffen, K. (1973). Aspect comparatif de la synthèse de stéroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de Poulet à différents stades du développement (étude en culture organotypique à partir de précurseur radioactifs). *Gen. Comp. Endocrinol.* 20, 16-28.
- Guichard, A., Cedard, L., Mignot, Th.-M., Scheib, D., and Haffen, K. (1977). Radioimmunoassay of steroid produced by cultured chick embryonic gonads: Differences according to age, sex, and side. *Gen. Comp. Endocrinol.* 32, 255-265.
- Guichard, A., Haffen, K., Cedard, L., Mignot, Th.-M., and Scheib, D. (1979). Effects of hCG and of season on *in vitro* steroidogenesis by 18-day chick embryo gonads. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 19, 1317-1325.
- Huang, E. S., and Nalbandov, A. V. (1979). Steroidogenesis of chicken granulosa and theca cells: *In vitro* incubation system. *Biol. Reprod.* 20, 442-453.
- Jordanov, J., Angelova, P., Boyadjieva-Michailova, A., and Bakalska, M. (1978). Ultrastructure of de-

- ping interstitial cells in chick embryonic gonads in relation to their genesis and steroidogenic function. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 92, 449-464.
- Reid, O., Wreford, N. M. G., de Kretser, D. M. S. (1981). Morphological and functional characteristics of rat Leydig cells isolated on Percoll gradients. Is Leydig cell heterogeneity *in vitro* an artifact? *Mol. Cell. Endocrinol.* 42, 73-90.
- Reid, B. L., and Hertelendy, F. (1983). Steroid metabolism by avian ovarian cells during follicular maturation. *Biol. Reprod.* 29, 953-962.
- Reid, R., and Adler, R. (1966). Submicroscopical observations on the differentiation of chick gonads. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 16, 41-47.
- Reid, R., and De Robertis, E. M., Jr. (1968). Fetal evolution of steroidogenic cells in the chick ovary. *Histochemie* 15, 187-193.
- Reid, R., and Kolodny, L. (1964).  $\Delta^5$ - $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in differentiating chick gonads. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 63, 613-617.
- Reid, R. A., Downing, J. R., and Wong, K.-L. (1980). Luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two populations of Leydig cells. *Endocrinology* 106, 1424-1429.
- Reid, R. A., and Gomar, Y. (1984). Onset of the response to chorionic gonadotropin in the chick embryonic testis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 54, 344-351.
- Reid, R. A., and Nathaiz, R. (1972). Evolution of the germ bodies in the embryonic chick gonad. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 28, 133-140.
- Reid, R. A., and Wong, K.-L. (1963). The use of lead citrate as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 187-193.
- Reid, R. A., and Haffen, K. (1967). Etude histochimique de la  $3\beta$ -hydroxistéroïde déshydrogénase dans les jeunes gonades embryonnaires de poulet. *C. R. Acad. Sci.* 264, 161-164.
- Reid, R. A. (1962). Steroids in the follicular fluid and corpus luteum of the mare: A "Two-cell type" theory of ovarian steroid synthesis. *J. Endocrinol.* 24, 59-63.
- Teng, C. T., and Teng, C. S. (1977). Studies on sex organ development: The hormonal regulation of steroidogenesis and adenosine 3'5' cyclic monophosphate in embryonic chick ovary. *Biochem. J.* 162, 123-134.
- Teng, C. T., and Teng, C. S. (1979). Studies on sex organ development: Separation and culture of steroid-producing cells from growing and regressing embryonic ovaries. *Endocrinology* 104, 1337-1343.
- Teng, C. T., Teng, C. S., Bousfield, G. R., Liu, W. K., and Ward, D. N. (1982). Differential response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* 48, 325-332.
- Tennant, J. R. (1964). Evaluation of the trypan blue technique for the determination of cell viability. *Transplantation* 2, 685-694.
- Weniger, J.-P., and Zeis, A. (1971). Biosynthèse d'oestrogènes par les ébauches gonadiques de Poulet. *Gen. Comp. Endocrinol.* 16, 391-395.
- Woods, J. E., and Bruzill, D. M. (1981). Plasma  $17\beta$ -estradiol levels in the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44, 37-43.
- Woods, J. E., and Erton, L. H. (1978). The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 36, 360-370.
- Woods, J. E., Menneilla, J. A., and Thommes, R. C. (1981). The hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axes in the developing chick embryo. LH sensitivity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 45, 66-73.
- Woods, J. E., and Podczaski, E. S. (1974). Androgen synthesis in the gonads of the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 24, 413-423.
- Woods, J. E., and Weeks, R. L. (1969). Ontogenesis of the pituitary-gonadal axis in the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 13, 242-254.

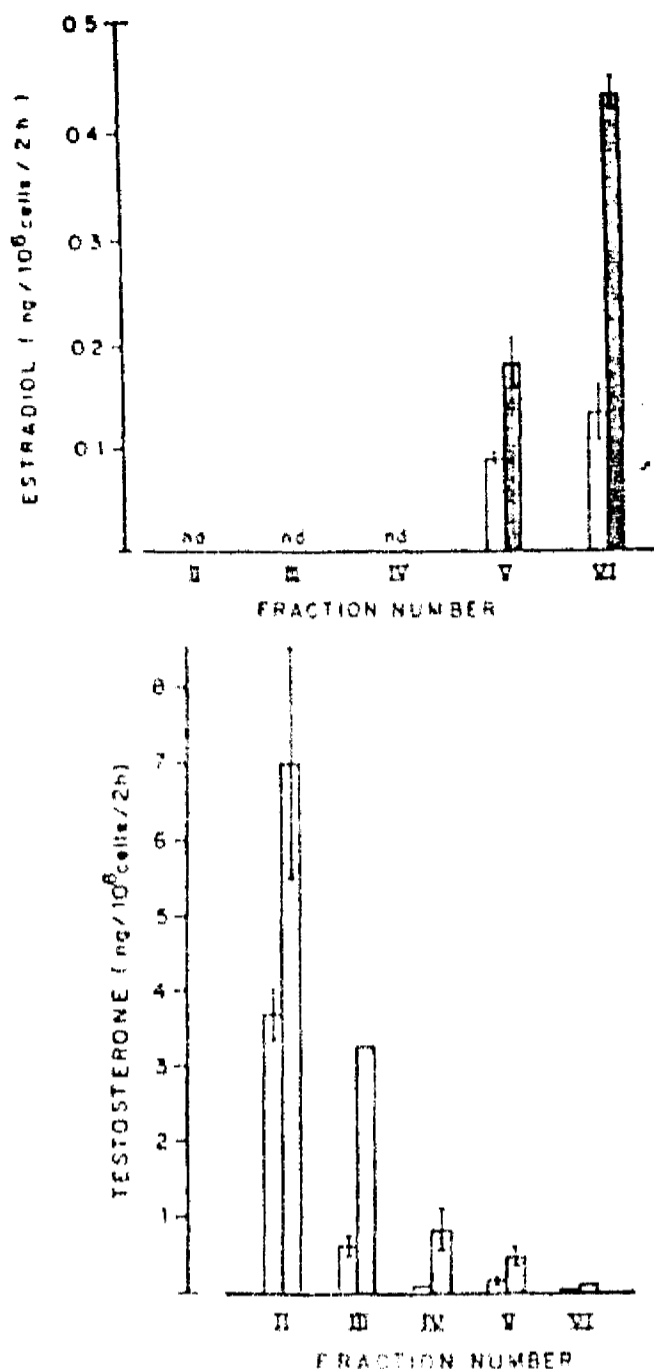


FIG. 8. Secretion of  $17\beta$ -estradiol and testosterone in isolated ovarian cells of density gradient fractions. The incubation was performed under basal ( $\square$ ) and hCG (1.0 IU/ml) stimulated ( $\blacksquare$ ) conditions. Ovaries were obtained from Rhode Island chickens. Values represent means  $\pm$  SD.

lated to the number of cells without lipids (Fig. 7).

The results reported in the preceding paragraph were obtained from ovaries of newly hatched White Leghorn chickens, but a similar phenomenon was observed with ovaries from Rhode Island chickens. The basal- and hCG-stimulated secretion of  $17\beta$ -estradiol and testosterone were measured in the same fractions of the density

gradient; testosterone maximum values were obtained in the fraction of low density and  $17\beta$ -estradiol in the fraction of high density (Fig. 8). It should be noted that  $17\beta$ -estradiol secretion by isolated ovary cells is higher in White Leghorn (Fig. 7) than in Rhode Island chickens (Fig. 8).

When [ $7\text{-}^3\text{H}$ ]testosterone metabolism was evaluated in the fractions of ovarian cells obtained from density gradients,  $17\beta$ -estradiol and estrone biosynthesis were found maximal in fraction VI, whereas in other fractions  $\Delta_4$ -androst-3,17-dione was the greatest metabolite. Fractions II and III had little or no capacity to synthesize estrogens (Table II). Other androgens, dehydroepiandrosterone, androsterone, and  $5\alpha$ -dihydrotestosterone were found in only minute quantities as compared with androstenedione production. In fraction V, unidentified steroids were produced in a considerable amount (Table II).

#### DISCUSSION

The ovarian cell suspension obtained after trypsin dissociation secreted  $17\beta$ -estradiol and testosterone *in vitro*. The steroid hormone secretion was incremented in function of the incubation time and the dose of hCG added to the medium. These results validate the method employed for the isolation of functional ovarian cells. After the fractional trypsinization, cells were mainly obtained from the ovarian medulla, since the number of germinal cells were markedly reduced in the fraction employed; although, the presence of a low percentage of cells from the cortex was observed.

Low density cells (Fraction II) obtained after isopycnic separation are typical steroidogenic cells according to the ultrastructural pattern and the positive reaction for  $\Delta^5\text{-}3\beta\text{-HSD}$ . This cellular type secreted testosterone according to the results obtained in radioimmunoassay measurements. When cells of fraction II were incubated with tritiated testosterone, labeled androstenedione was obtained indicating the presence of

TABLE 2  
 STEROID HORMONES PRODUCED BY THE OVARY CELL FRACTIONS AFTER INCUBATION WITH  
 (7-<sup>3</sup>H)TESTOSTERONE EXPRESSED AS PERCENTAGE OF TRANSFORMATION

Fraction number	Testosterone	Androstenedione	Estrone	17 $\beta$ -Estradiol	Unidentified steroids
II	81.6	14.35	0.12 $\pm$ 0.02	0.01	0.65
III	71.1 $\pm$ 1.2	20.5 $\pm$ 0.3	0.20 $\pm$ 0.1	0.08	3.35 $\pm$ 0.7
IV	40.5 $\pm$ 3.1	16.5 $\pm$ 3.0	0.85 $\pm$ 0.1	0.31	26.3 $\pm$ 0.1
V	13.5 $\pm$ 2.0	18.8 $\pm$ 2.5	2.42 $\pm$ 0.08	0.54	56.5 $\pm$ 0.5
VI	28.4 $\pm$ 2.1	5.0 $\pm$ 0.6	10.75 $\pm$ 0.2	2.0	41.0 $\pm$ 1.0

Note. Values are the means of two experiments, for androstenedione, estrone, and unidentified compounds. In one experiment the TLC was developed in methylene chloride:ethyl acetate, 8:2; in the second one, after LH-20 column, in benzene:methanol, 9:1, and TLC with hexane:diethyl ether, 3:1. The values for 17 $\beta$ -estradiol were obtained after chromatography in LH-20 and TLC in the same solvent systems described above. Testosterone values represent the remaining percentage.

17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity. On the other hand, estrogen secretion was not detected by radioimmunoassay in this ovarian cell subpopulation, and the labeled estrone and 17 $\beta$ -estradiol found after incubation with tritiated testosterone exhibited negligible amounts. In consequence, these findings strongly suggest that steroidogenic cells which have been described in the ovarian medulla of the chicken (Narbaitz and Adler, 1966; Jordanov *et al.*, 1978; González-Morán *et al.*, 1985) secrete androgens but not estrogens.

In fraction VI from the density gradient, the highest 17 $\beta$ -estradiol secretion was registered and the maximal aromatizing capacity could be inferred from the result of testosterone isotopic transformation. In this fraction at least three cellular types could be identified: (a) prefollicular cells, (b) typical steroidogenic cells, and (c) relatively undifferentiated cells. Prefollicular cells could be recognized by the presence of "lining bodies" in the plasmalema (Rahil and Narbaitz, 1972; Carlon and Erickson, 1978). These cells only represented 2% of fraction VI; therefore, it would be difficult to attribute to prefollicular cells the estrogen secretion in fraction VI. Moreover, prefollicular cells predominate in the ovarian cortex, and the fraction corresponding to the cortex during trypsinization did not secrete

measurable amounts of steroid hormones. A low percentage (3–5%) of typical steroidogenic cells was observed in fraction VI, but no correlation has been found between the number of these cells and 17 $\beta$ -estradiol levels. All evidence suggests that estrogens would be secreted by the population of relatively undifferentiated cells that represent 85% of the cells in fraction VI.

A previous ultrastructural study described an epithelial compartment in the ovarian medulla of the newly hatched chicken (González del Pliego *et al.*, 1988). Within this compartment, two cellular types have been recognized: (a) typical steroidogenic cells and (b) poorly differentiated cells. Poorly differentiated cells are the main component of the ovarian medulla, while 18% of the ovarian medulla is occupied by steroidogenic cells (González-Morán *et al.*, 1985). In the present study the percentage of steroidogenic cells in the ovarian medulla was confirmed, and steroid-hormone secretion contributed to explain the function of cellular subpopulations in the ovarian medulla. Typical steroidogenic cells secrete androgens, and relatively undifferentiated cells would probably be the source of estrogens.

Separation of subpopulations was obtained from ovarian cells in White Leghorn

Regional distribution of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase, and aromatase activities in the early fetal bovine ovary.

Marco Antonio Juárez Oropeza and Georgina Alvarez-Fernández.  
Department of Biochemistry, School of Medicine, UNAM.  
P.O. Box 70-159, Mexico, D.F. 04510,  
MEXICO.

and

Verónica Lopez, Simón Kawa, and Enrique Pedernera.  
Department of Embryology, School of Medicine, UNAM.  
Mexico, D.F. 04510,  
MEXICO.

Short Title: Regional steroidogenesis in fetal ovary.

Address to Correspondence and Proofs:

Dr. Marco Antonio Juárez-Oropeza.  
Department of Biochemistry,  
School of Medicine, UNAM.  
P. O. Box 70-159,  
Mexico, D.F. 04510.  
MEXICO.

#### SUMMARY

Cell suspensions obtained from cortex and medulla of the ovary from early bovine fetuses of 4-10 cm crown-rump length (CRL) were examined in vitro for their capabilities to metabolize radiolabeled exogenous precursors. Pregnenolone and dehydroepiandrosterone metabolism were employed to estimate 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase activity (3 $\beta$ -HSD), whereas androstenedione and testosterone metabolism were used to evaluate aromatase activity. Furthermore, 17 $\beta$ -estradiol and testosterone production from androstenedione metabolism were taken as index of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD). Results show an asymmetric distribution of enzyme activities; higher 3 $\beta$ -HSD and 17 $\beta$ -HSD activities were found in the medulla compared to the cortex of the same ovary, whereas aromatase activity was found homogeneously distributed in both ovarian regions. In addition, ovaries from 4 to 6 cm CRL fetuses were found more active in steroidogenesis than ovaries from larger fetuses. Estrone biosynthesis was higher than 17 $\beta$ -estradiol by either ovarian region. These data provide evidence that in bovine fetal ovary the activity of steroidogenic enzymes is not homogeneously distributed in cortex and medulla and suggest the existence of more than one cell population with different steroidogenic capabilities.

Estrogen biosynthesis or secretion has been observed in fetal ovaries of several mammalian species such as rat, mice, rabbit, sheep, hamster, guinea pig, human and bovine (1-8).

On the other hand, it has been suggested in adult ovary the "two cell theory", postulating that estrogen production is predominantly carried out by granulosa cells which aromatize androgen of thecal origin (9-11). Nevertheless, there are not studies on this matter in fetal ovaries.

The initial studies of Shemesh (12-14) established that the bovine fetal ovaries synthesized and secreted  $17\beta$ -estradiol when the sex of bovine embryonic gonads became morphologically distinguishable at  $45 \pm 3$  days (3.3-4.1 cm crown-rump length, CRL). The production of  $17\beta$ -estradiol persisted throughout 4 to 8 cm CRL and then decreased to undetectable values when the cultured ovaries from 10-20 cm CRL fetuses were assessed.

The morphological changes observed in the ovary of 4-10 cm CRL fetus involve the bursting growth of cortex and the relative involution of medulla. Consequently, the purpose of the present study is a first attempt to know if the "two cell theory" operates at the time of gonadal differentiation, investigating the steroidogenic capabilities of each region -cortex and medulla- using radiolabeled precursors.

## EXPERIMENTAL

### Materials.

[7-<sup>3</sup>H]-testosterone (29.0 Ci/mmol), [1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)]-testosterone (93.9 Ci/mmol), [7-<sup>3</sup>H(N)]-pregnenolone (17.7 Ci/mmol), [1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)]-androstenedione (93.0 Ci/mmol, 4-androstene-3,17-dione), and [1,2-<sup>3</sup>H(N)]-dehydroepiandrosterone (58.6 Ci/mmol) were purchased from New England Nuclear (Boston, MA).

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) and trypsin were obtained from Grand Island Biological Co. (Grand Island, NY); soybean trypsin inhibitor, bovine serum albumin (BSA), pregnenolone, 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone, progesterone, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone, testosterone, 4-androsten-3,17-dione, 5 $\alpha$ -androsterone, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, dehydroepiandrosterone, 5 $\alpha$ -androstenedione, estrone and 17 $\beta$ -estradiol were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Sephadex-LH20 was obtained from Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden). Thin-layer chromatography (tlc) was performed on silica gel 60 F<sub>254</sub>-coated aluminium sheets (Merck, Mexico).

Repurification of radiolabeled steroids was performed on tic-plates silica gel 60 (without fluorescent indicator, Merck).

### Ovarian cell preparations.-

Ovaries from 47 bovine fetuses (Bos indicus) between 4 to 10 cm CRL in size (47-75 gestation days), were obtained after



slaughter, immediately submerged in culture medium (1% BSA in DMEM) and maintained from 2 to 4 hours at room temperature until they were processed. Cortex and medulla of each ovary were carefully dissected and incubated in 0.25 % trypsin in balanced salt solution ( $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  free) at 37°C in a shaking bath (90 cycles/min) to obtain a cell suspension from each region. Ovarian cells recovered after 10 minutes of incubation were treated with 0.5 % soybean trypsin inhibitor followed by two changes of medium, DMEM with 0.1 % of BSA. One aliquot was taken to count the final cell number with the aid of a hemocytometer, and viability was established by the trypan blue exclusion method (15). In all cases cellular mortality ranged from 5-10 %.

Cell suspensions (100  $\mu\text{l}$ ) were incubated for 1 hour at 37°C in a shaking bath (90 cycles/min) under 5%  $\text{CO}_2$  and 95% air in 900  $\mu\text{l}$  of Dulbecco's medium with 0.1 % BSA and 10  $\mu\text{l}$  of ethanolic solution of radiolabeled steroids as substrates.

Steroid biosynthesis from radioactive pregnenolone.-

(7- $^3\text{H}$ )-Pregnenolone was used to know the steroidogenic capabilities of each ovarian region (cortex and medulla). For this purpose, ovarian cell samples from 4 and 6 cm CRL fetuses were incubated with 0.05  $\mu\text{Ci}$  of pregnenolone. Incubation was stopped by 10 vol of cold diethyl ether addition. Cells were extracted three times with 10 vol of diethyl ether each time. Extracts were evaporated under nitrogen stream at 37°C and reconstituted with 100  $\mu\text{l}$  of

absolute ethanol. Aliquots of 40  $\mu$ l from extracts containing radiolabeled steroids were supplemented with the following steroids (0.5-1.0  $\mu$ g each per sample) serving as internal standards: pregnenolone (P<sub>1</sub>), progesterone (P<sub>2</sub>), 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone (17 $\alpha$ -DHP<sub>1</sub>), 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (17 $\alpha$ -DHP<sub>2</sub>), 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone (20 $\alpha$ -DHP), androstenedione (A<sub>1</sub>), testosterone (T), dehydroepiandrosterone (DHEA), 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>1</sub>) and estrone (E<sub>2</sub>). Pregnenolone and its metabolites were separated by column chromatography followed by thin layer chromatography as previously reported [16,17]. Briefly, 20 fractions collected at two minutes intervals from Sephadex-LH20 column chromatography (7.5 x 0.5 cm) eluted with benzene: methanol (9:1, v/v) solvent systems were developed individually by tic with methylene chloride: ethyl acetate, 80:20 (v/v). The detection of standard steroids was made by uv absorption and by visualization after charring at 120°C for 15 min with sulfuric acid: water, 1:1 (v/v). Regions corresponding to authentic standards were scrapped into scintillation vials and subsequently evaluated for radioactivity in a Packard Tri-Carb 3255 liquid scintillation spectrometer.

Dehydroepiandrosterone metabolism (activity of 3 $\beta$ -hydroxy steroid dehydrogenase, delta 5-4 isomerase).-

With the aim to evaluate 3 $\beta$ -HSD activity in both regions of the fetal ovary, ovarian cell samples from 4 to 9 cm CRL

fetuses were incubated with 0.1  $\mu$ Ci of (1,2- $^3$ H(N))-dehydroepiandrosterone (1,148 fmol). Dehydroepiandrosterone metabolites and the following steroids (0.5-1.0  $\mu$ g each per sample) serving as internal standards: androstenedione (A<sub>4</sub>), testosterone (T), dehydroepiandrosterone (DHEA), 5 $\alpha$ -androstenedione (5 $\alpha$ -adione), 5 $\alpha$ -androsterone (5 $\alpha$ ), 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT), 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) and estrone (E<sub>1</sub>) were separated by tlc developed with methylene chloride: ethyl acetate, 80:20 (v/v) and by other tlc developed with diethyl ether: hexane, 3:1 (v/v). The detection of standard steroids was made by uv absorption and by visualization after charring at 120°C for 15 min with sulfuric acid: water, 1:1 (v/v). In addition, some ovaries were processed for histochemical determination of 3 $\beta$ -HSD by the method used by Burden et al [24], with dehydroepiandrosterone as substrate.

Androstenedione metabolism (aromatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activities). -

To evaluate the activities of aromatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, ovarian cortex and medulla cell samples from 4 to 10 cm CRL fetuses were incubated with 0.1  $\mu$ Ci of (1,2,6,7- $^3$ H(N))-androstenedione (1,170 fmol). Androstenedione metabolites were separated and identified as mentioned in assay of 3 $\beta$ -HSD.

#### Testosterone metabolism (aromatase activity).-

To assess the aromatase activity, ovarian cell samples from 4 to 10 cm CRL fetuses were incubated with 0.03  $\mu$ Ci of (1,2,6,7- $^3$ H(N))-testosterone (300 fmol). These results were compared with other series of experiments performed with (7- $^3$ H(N))-testosterone (data are not shown) to estimate percentage recovery and to know indirectly if there was loss of radioactivity by tritiated water formation. Since both procedures were in agreement to radioactivity recovery (more than 95%), only (1,2,6,7- $^3$ H(N))-testosterone was used in the present study.

#### Calculation of steroid production.-

Since radioactivity recuperation for any precursor ranged from 90-95 %, no corrections were made for steroid production. In all cases, percentage transformation was calculated for each metabolite identified and enzyme activity was expressed as fmol of steroid/ $1 \times 10^6$  cells/h.

## RESULTS

#### Steroid biosynthesis from radioactive pregnenolone.-

When tritiated pregnenolone was used as substrate, several steroids were synthesized including progestins, androgens and estrogens (Table 1). Moreover, it was impossible to

assign final identification to other metabolites. Although the transformation percentage differ for each compound and ovarian region, the results indicated that the enzymes involved in androgen and estrogen synthesis from pregnenolone, are present in both regions at this time of development. To evaluate differences between cortex and medulla in the pregnenolone metabolism, the androgen/progestin ratio was calculated in both ovarian regions; results shown a higher accumulation in cortex respect to medulla in the two ages studied (Table 2).

To explore if delta-4 or delta-5 pathway was preferred in cell suspensions studied, the (P. + A.) / DHEA ratio was estimated. Results suggest that 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, delta 5-4 isomerase activity, although present in the two regions studied, is two folds higher in medulla than cortex from 4 and 6 cm CRL fetuses (Table 2).

Dehydroepiandrosterone metabolism (3 $\beta$ -HED, delta 5-4 isomerase). -

Androstenedione (from 5.9 to 34.5 %), estrone (from 0.5 to 22.3 %), testosterone (from 1.0 to 3.4 %) and 17 $\beta$ -estradiol (from 0.7 to 5.9 %) were the principal steroids produced from dehydroepiandrosterone metabolism by either ovarian region in the fetuses studied. Since all compounds involve the preceding 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, delta 5-4

isomerase activity, they were considered for enzyme activity expression. Cell suspensions of medulla had higher  $3\beta$ -HSD activity compared with cortex. As shown in Fig. 1, synthesis of delta-4 steroids was always greater in medulla between 4 to 6 cm CRL stages. Moreover, the major activity was observed in ovaries from 4 to 6 cm CRL fetuses, and then declined showing similar values in both regions. A positive reaction for the  $3\beta$ -HSD in the yuxtacortical region of the medulla was shown by the histochemical study (Fig. 2).

Androstenedione metabolism ( $17\beta$ -HSD and aromatase activities).-

Higher metabolites synthesized by both fetal ovarian regions from radioactive androstenedione were estrone (from 3.4 to 47.2 %),  $17\beta$ -estradiol (from 2.5 to 49 %) and testosterone (from 0.4 to 2.7 %). Other metabolites were found in only minute quantities as compared with testosterone production. Testosterone and  $17\beta$ -estradiol synthesis involve  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity, whereas estrone and  $17\beta$ -estradiol, the aromatase activity. Thence, enzyme activities were calculated as shown in Figs. 3 and 4. Testosterone and  $17\beta$ -estradiol synthesis were found higher in medulla than cortex in ovaries from 4 to 6 cm CRL fetuses. Moreover, maximal synthesis was observed at ages

corresponding to fetuses of 4 to 8 cm CRL. Since the contribution of testosterone accumulation to index of  $17\beta$ -HSD activity was minimal (0.4 to 2.7 %),  $17\beta$ -estradiol production is the best estimation of this enzyme activity. On the other hand, accumulation of estrone and  $17\beta$ -estradiol was taken as index of aromatase activity. Although slightly superior in medulla, the enzyme activity showed similar values in both ovarian regions. Maximal synthesis was observed at 4 to 6 cm CRL stages (Fig. 4). Furthermore, estrone synthesis by either ovarian region was found higher than  $17\beta$ -estradiol, as indicated by  $E_1/E_2$  ratio (Table 3).

#### Testosterone metabolism (aromatase activity).-

When testosterone was used as substrate, only  $17\beta$ -estradiol was isolated as product (from 0.7 to 12.3 %). Androstenedione and estrone were not found under the present experimental conditions. Other metabolites exhibited negligible amounts. Cortex and medulla exhibited similar values of aromatase activity (Fig. 5). In both regions, maximal synthesis of  $17\beta$ -estradiol was present in ovaries from 4 to 6 cm CRL fetuses.

## DISCUSSION

The present work demonstrates that the ovarian cell suspensions of cortex and medulla from 4 to 6 cm CRL fetuses have not the same steroidogenic capabilities to metabolize exogenous radioactive precursors. Thus, it could be postulated that the activity of steroidogenic enzymes in the early bovine fetal ovary, although present in both regions, are not homogeneously distributed in cortex and medulla. Several lines of biochemical and histochemical evidence support this concept. First, in experiments with dehydroepiandrosterone, the index of  $3\beta$ -HSD activity was higher in medulla than in cortex. This observation is confirmed by both, the index of  $3\beta$ -HSD estimated from pregnenolone metabolism and the positive histochemistry for  $3\beta$ -HSD in the yuxtacortical medulla. Second, the index of  $17\beta$ -HSD activity estimated by androstenedione metabolism was greater in medulla as compared to cortex. Finally, it was impossible to find differences between cortex and medulla, respect to aromatase activity evaluated by androstenedione metabolism. The aromatase distribution was confirmed in the testosterone metabolism studies. This implies that aromatase is homogeneously distributed in both cellular suspensions, whereas the other two enzymes are asymmetrically localized in the ovary, whose medulla is enriched. Together these observations suggest that, as in adult rat ovary (18) and neonatal chick ovary (17), the bovine fetal ovary contains



at least two cell populations with unequal steroidogenic capabilities, in this case distinguishable by 3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD and aromatase activities. Then, these enzymes could be employed as markers for cellular purification and further characterization of these cells. Alternatively, if cellular populations are distributed homogeneously in the ovary, then local regulators of steroidogenesis could be operating asymmetrically in cortex and medulla. Isolation of ovarian cellular populations may provide answers to these possibilities.

The ability of the early bovine fetal ovary to synthesize steroids appears to be reduced in ovaries from fetus of 8 to 10 cm CRL. These results are in agreement with the 17 $\beta$ -estradiol in vitro secretion measured by radioimmunoassay, as indicated in previous reports (13,14).

The transient steroidogenic activity of the fetal ovary found in this study have also been reported in the same [14] and other species (4,6,19,20). Nevertheless, in rat [21] 3 $\beta$ -HSD does not appear to decrease in older fetuses.

On the other hand, it has been reported that when aromatase activity is observed in fetal ovaries, one or both estrogens can be isolated with predominance of either estradiol (7,23) or estrone [22]. The present results indicate that bovine fetal ovary synthesizes more estrone than 17 $\beta$ -estradiol by either ovarian region, at least when they were assessed individually. However, the possibility that each region or

the whole gonad secrete more  $17\beta$ -estradiol during some stage of development is not excluded.

In addition, the fact that  $17\beta$ -estradiol was produced by androstenedione metabolism and no estrone was found in testosterone metabolism studies, could indicate that  $17\beta$ -HSD favors the formation of  $17\beta$ -estradiol. Furthermore, the fact that aromatase activity was higher with androstenedione than testosterone, suggests that the former is the best substrate for aromatase assay, at least in bovine fetal ovary studies. On the other hand, when isotopic pregnandione was employed as substrate, progestins were accumulated higher in medulla, whereas androgens were principally produced in cortex; these findings suggest that the fetal ovarian cortex had higher levels of cytochrome P-450 C<sub>17-20</sub> lyase. However, the analysis of this topic deserves further investigation.

The role of steroidogenesis in the early fetal ovary is not clear, but it has been suggested that it might be a local regulator of the ovarian differentiation (14). In this sense, isolation of cellular populations may be a first step to study gene expression and regulation of steroidogenic enzymes at this stage of development.

#### REFERENCES

1. Weniger J.P. and Zeis A.: Action de l'AMPc et de FSH sur la production d'oestrogènes par les gonades fœtales de rat en culture in vitro. C.R. Acad. Sci. Paris. 306 série III (1988) 257-260.
2. Terada N., Kuroda H., Nanki M., Kitamura Y. and Matsumoto K.: Augmentation of aromatase activity by FSH in ovaries of fetal and neonatal mice in organ culture. J. steroid Biochem. 20 (1984) 741-745.
3. George F.W., Simpson E.R., Milewich L. and Wilson J.D.: Studies on the regulation of the onset of steroid hormone biosynthesis in fetal rabbit gonads. Endocrinology. 105 (1979) 1100-1106.
4. Hauleon P., Bezaud J. and Terqui M.: Very early and transient 17 $\beta$ -estradiol secretion by fetal sheep ovary. In vitro study. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 17 (1977) 399-401.
5. Vomachka A.J. and DiMario K.B.: Perinatal hamster gonadal androgen and estradiol production in vitro and response to hCG. Biol. Neonate. 52 (1987) 40-47.

6. Bhall S.A. and Goy R.W.: Androgen and estrogen synthesis in the fetal guinea pig gonad. Biol. Reprod. 18 (1978) 160-169.
7. George F.W. and Wilson J.D.: Conversion of androgen to estrogen by the human fetal ovary. J. Clin. Endocrinol. Metab. 47 (1978) 550-555.
8. Roberts J.D. and Warren J.C.: Steroid biosynthesis in the fetal ovary. Endocrinology. 74 (1984) 848-852.
9. Falck B.: Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants. Acta Physiol. Scand 47 Suppl. 163 (1959) 1-101.
10. Short R.V.: Steroid in the follicular fluid and the corpus luteum of the mare. A "two cell type theory of ovarian steroid synthesis". J. Endocr. 24 (1962) 59-63.
11. Liu Y.X. and Haueh A.J.W.: Synergism between granulosa and theca-interstitial cells in estrogen biosynthesis by gonadotropin-treated rat ovaries: studies on the two-cell, two-gonadotropin hypothesis using antisera. Biol. Reprod. 35 (1986) 27-36.
12. Shemesh M., Allenberg M., Milaquir F., Ayalaón N. and Hansel W.: Hormone secretion by cultured bovine pre-

- and postimplantation gonads. Biol. Reprod. 19 (1978) 761-767.
13. Shemesh M.: Estradiol-17 $\beta$  biosynthesis by the early bovine fetal ovary during the active and refractory phases. Biol. Reprod. 23 (1980) 577-582.
  14. Shemesh M. and Hansel W.: Hormone production by the early bovine embryo. J. steroid Biochem. 19 (1983) 979-983.
  15. Tennant J.R.: Evaluation of the trypan blue technique for the determination of cell viability. Transplantation 2 (1964) 685-694.
  16. Alvarez-Fernández G.: Estudio de la esteroidogénesis en el ovario fetal de bovino. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Biología. UNAM (1989).
  17. Pedernera E., Gómez Y., Velázquez P., Juárez-Dropeza M.A. and González del Pliego M.: Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. Gen. Comp. Endocrinol. 71 (1988) 153-162.
  18. Takahashi H., Duleba A.J., Yuen B.H. and Moon Y.S.: Steroidogenic capabilities of various compartments of

- rat ovarian follicles in culture. *Steroids*. 44 (1984) 337-348.
19. Gondos B., George F.W. and Wilson J.D.: Granulosa cell differentiation and estrogen synthesis in the fetal rabbit ovary. *Biol. Reprod.* 29 (1983) 791-798.
  20. Imataka H., Suzuki K., Inano H., Kohmoto K. and Tamaoki B.I.: Developmental changes of steroidogenic enzyme activities in the embryonic gonads of the chicken: the sexual difference. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71 (1988) 413-418.
  21. Picon R., Darmoul D., Rouiller V., Duranteau L.: Activity of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ isomerase in the fetal rat ovary. *J. steroid Biochem.* 31 (1988) 839-843.
  22. Weniger J.P., Chouraqui J. and Zeis A.: Conversion of testosterone and progesterone to oestrone by the ovary of the rat embryo in organ culture. *J. steroid. Biochem.* 21 (1984) 347-349.
  23. Milewich L., George F.W. and Wilson J.D.: Estrogen formation by the ovary of the rabbit embryo. *Endocrinology.* 100 (1977) 187-198.

24. Burden, H.W. and Lawrence, I.E.: The effects of denervation on the localization of A<sup>1</sup>-3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the rat ovary during pregnancy. *Acta anat.* 97 (1977) 288-290.

LEGENDS FOR FIGURES.

Figure 1. Enzyme activity of  $3\beta$ -HSD/isomerase. Cell suspensions of cortex and medulla from ovaries of 4-9 cm CRL fetuses were incubated by 1 h at 37 °C with 1148 fmol of (1,2- $^3$ H) DHEA as substrate. The metabolites were isolated as described in the text. Each point represents the average of duplicate assays. Numbers in parentheses indicate the amount of fetuses studied. Bars express the S.D.

Figure 2. Histochemistry of  $3\beta$ -HSD in a cryosection of fetal ovary from 8 cm CRL fetus. DHEA was used as substrate. The yuxtacortical medulla exhibit activity (arrowhead).

Figure 3. Enzyme activity of  $17\beta$ -HSD. Cell suspensions obtained from cortex and medulla of ovaries from 4-10 cm CRL fetuses were incubated by 1 h at 37 °C with 1170 fmol of (1,2,8,7- $^3$ H) 4-androstene-3,17-dione as substrate. The metabolites were isolated as described in the text. Each point represents the average of duplicate assays. Numbers in parentheses indicate the amount of fetuses studied. Bars express the S.D.

Figure 4. The aromatase activity was evaluated in cell suspensions of cortex and medulla from ovaries of 4-10 cm CRL fetuses, incubated by 1 h at 37 °C with 1170 fmol of (1,2,6,7- $^3$ H) 4-androstene-3,17-dione as



substrate. The metabolites were isolated as described in the text. Each point represents the average of duplicate assays. Numbers in parentheses indicate the amount of fetuses studied. Bars express the S.D.

Figure 5. The aromatase activity was assessed in cell suspensions of cortex and medulla by testosterone metabolism. Each region was incubated by 1 h at 37 °C with isotopic testosterone as indicated in the text. The production of 17 $\beta$ -estradiol is expressed as a function of fetus CRL size. Symbols indicate the number of fetuses studied (\*,3 and \*\*,4). Data are expressed as mean  $\pm$  S.D.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Mrs. Araceli Granados de Méndez for careful manuscript review and Mr. Alfredo Gamboa Romero of the Microcinematography Lab., Department of Biology, School of Sciences, UNAM, for photographs.

Table 1. Percentage transformations from pregnenolone to metabolites.

Steroid	4 cm CRL Fetus		8 cm CRL Fetus	
	Cortex (0.084)⊙	Medulla (0.214)⊙	Cortex (1.080)⊙	Medulla (0.512)⊙
P5 remnant	52.90	53.70	24.30	58.25
C21 steroids				
P4	8.20	13.30	4.65	10.10
20 $\alpha$ -OHP4	0.75	1.54	4.79	1.28
17 $\alpha$ -OHP4				
17 $\alpha$ -OHP5	n.d.	4.60	9.35	5.20
C19 steroids				
DHEA	10.45	8.30	24.70	15.10
A4	3.22	1.80	5.70	5.30
T	3.81	4.33	10.87	2.80
C18 steroids				
E1	0.23	0.03	0.91	1.10

\* Figures for 20 $\alpha$ -OHP4 involve to 17 $\alpha$ -OHP4  
 ⊙ Number of cells (in millions) incubated.

Table 2. Index of 3 $\beta$ -HSD and C17-20 lyase enzyme activities in the cortex and the medulla of the early bovine fetal ovary.

CR-length (cm)	(P4 + A4)/DHEA		(C19 / C21)	
	Cortex	Medulla	Cortex	Medulla
4	0.90	1.83	2.5	0.7
6	0.42	1.02	2.2	1.4

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Table 3. Relationship between the synthesis of 17 $\beta$ -estradiol and estrone in the cortex and the medulla of the fetal ovary.

C-R length (cm)	n	(E2 / E1)	
		Cortex	Medulla
4.0-5.0	(4)	0.2 $\pm$ 0.02	1.2 $\pm$ 0.87
6.0	(2)	0.4 $\pm$ 0.23	0.7 $\pm$ 0.24
7.0-8.5	(2)	0.4 $\pm$ 0.13	0.3 $\pm$ 0.02
9.0-10.0	(3)	0.8 $\pm$ 0.34	0.8 $\pm$ 0.51

Values are expressed as mean  $\pm$  S.D.  
 Numbers in parentheses indicate the amount of fetuses studied.

FIGURE 1

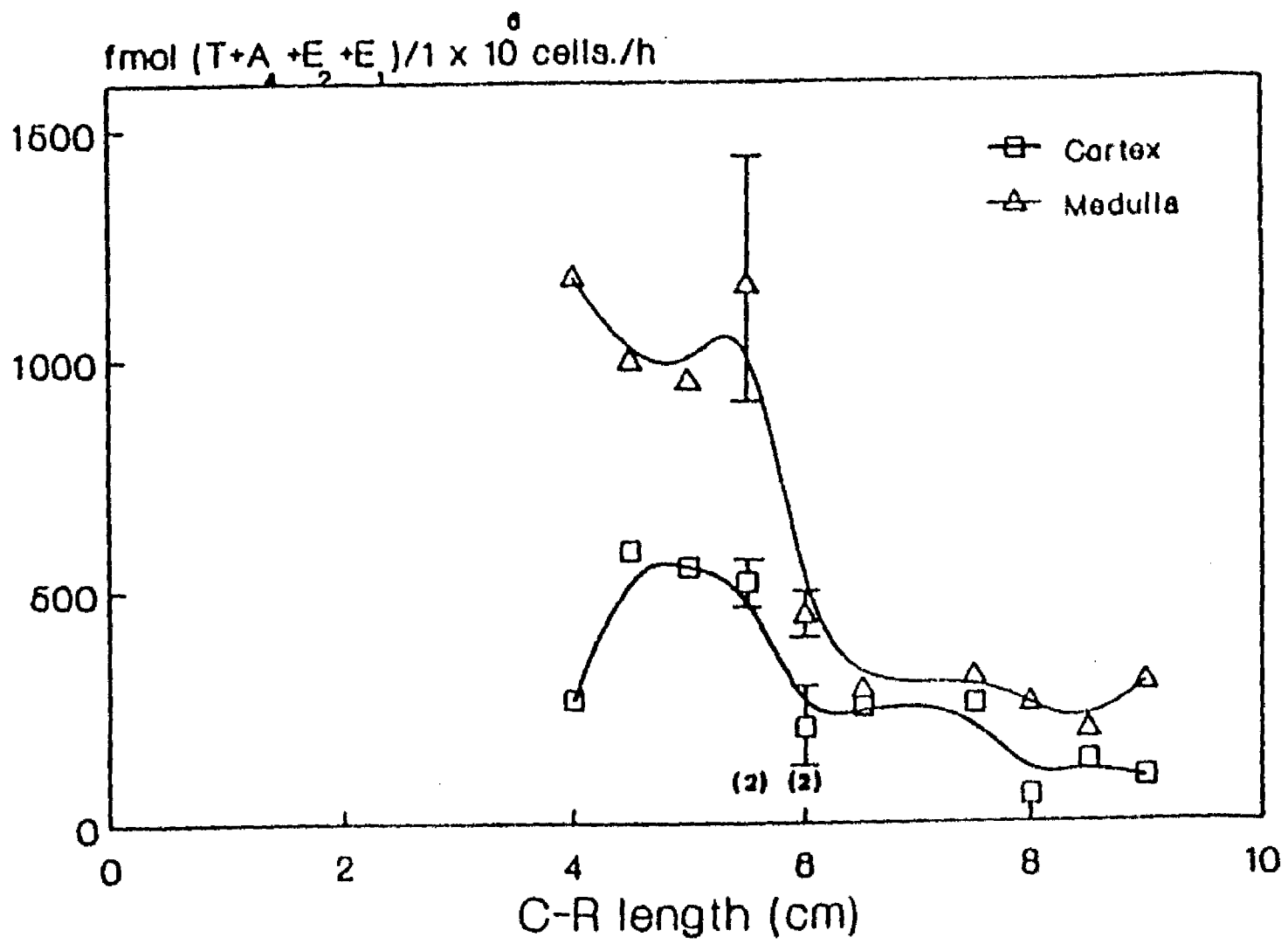




FIGURE 2

FIGURE 3

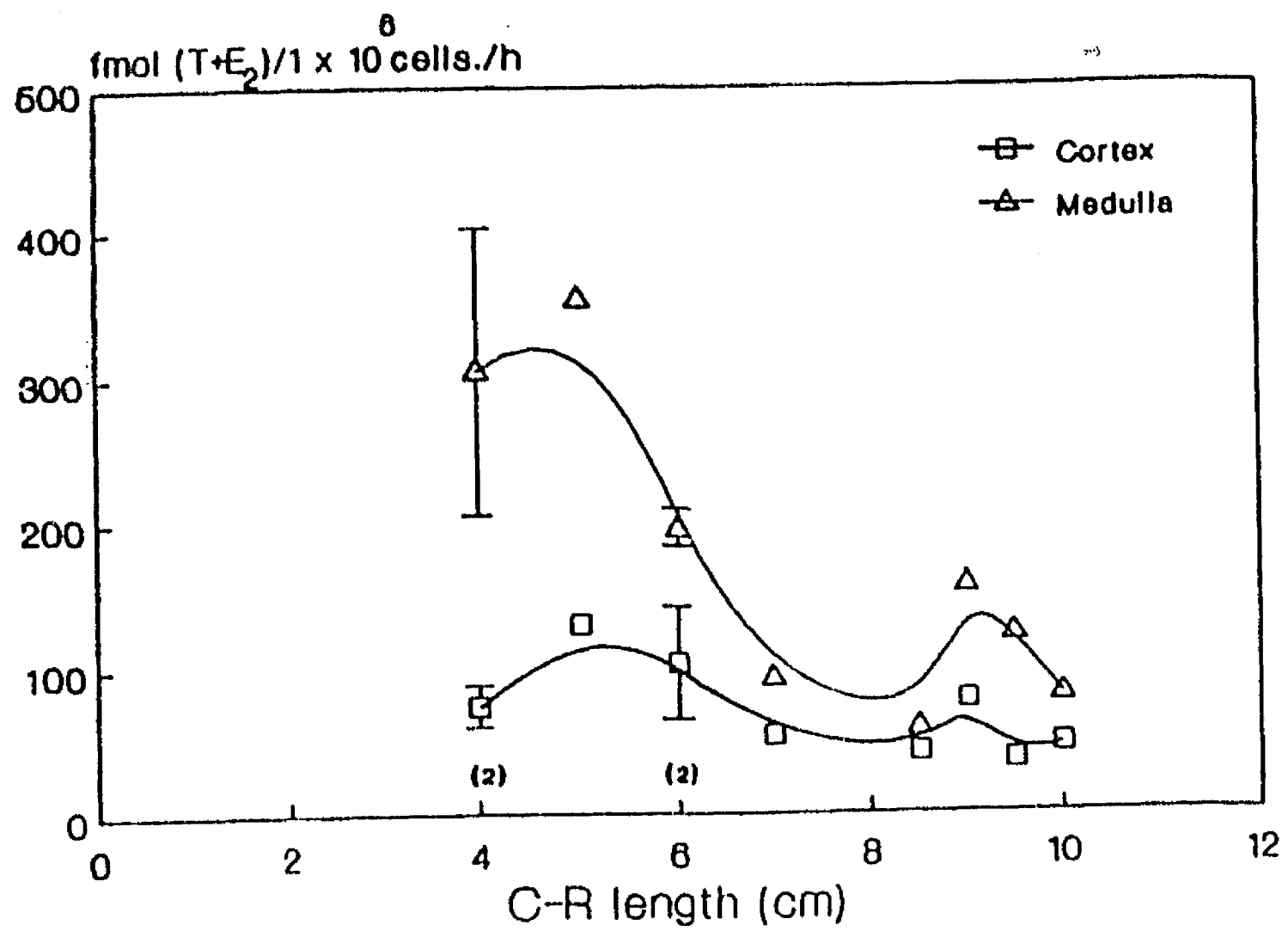




FIGURE 4

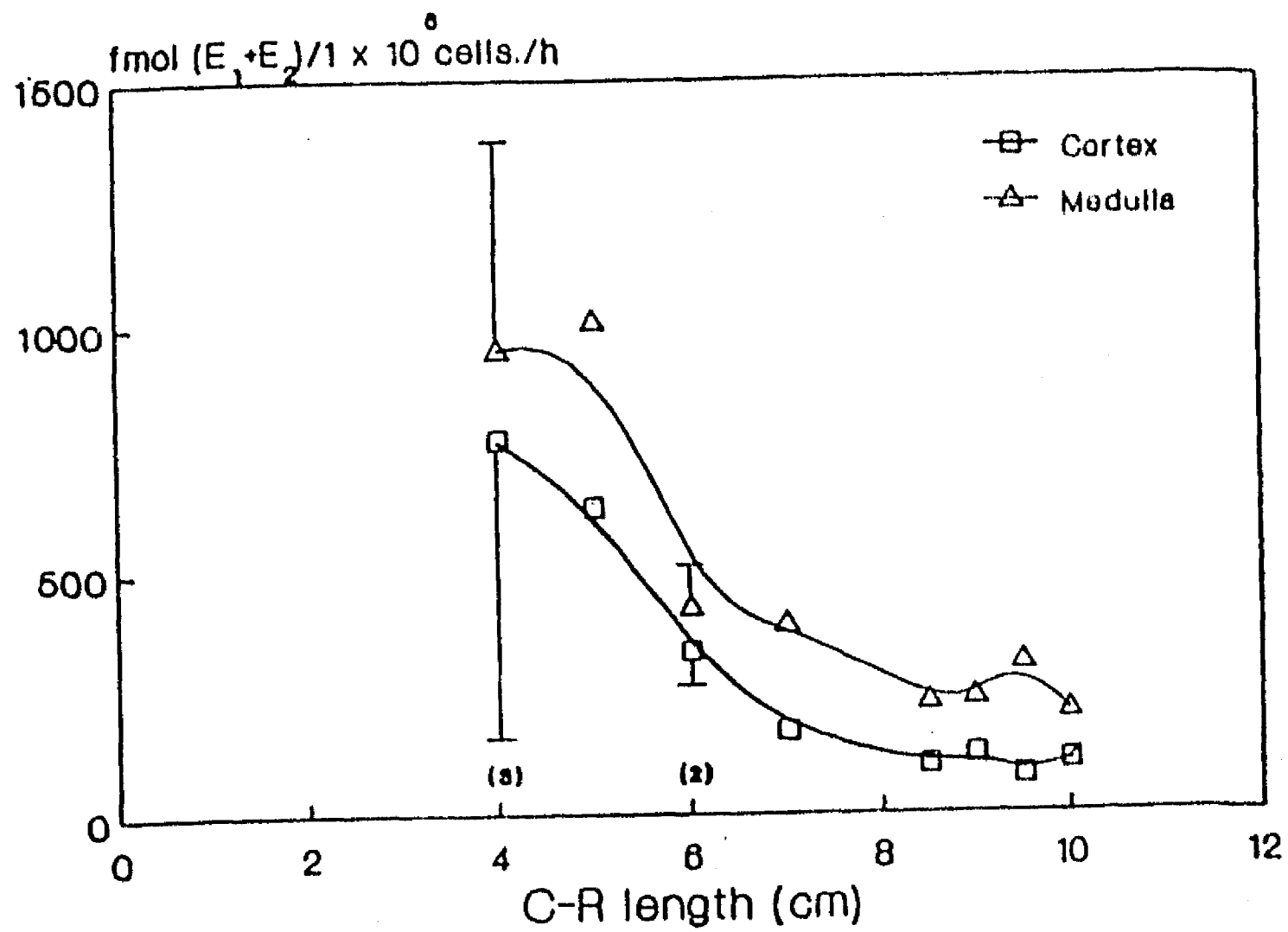
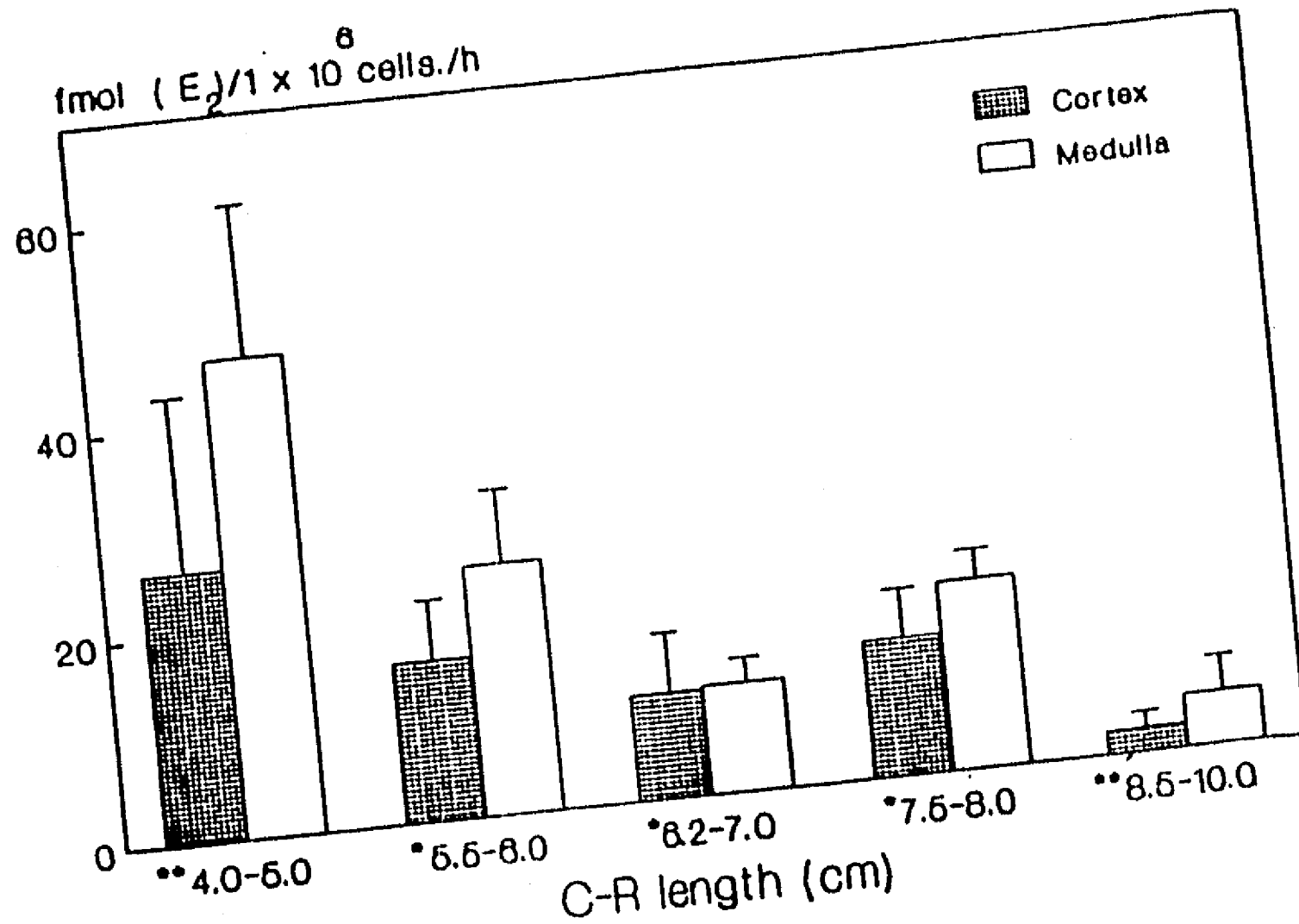


FIGURE 5



## FE DE ERRATAS

- p. 25 Falta el primer renglón, que debe decir:  
"diferencias en la actividad de aromataasa, expresada como"
- p. 26 Falta el primer renglón, que debe decir:  
"Aunque la formación de estrógenos no es esencial para"
- p. 27 Falta el primer renglón, que debe decir:  
**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**
- p. 30 Falta el primer renglón, que debe decir:  
"el uso de precursores tritiados, anteriormente"

Faltó indicar la numeración de las siguientes páginas:

16, 49, 50, 53, 54, del cuerpo de la tesis;  
159, 162, del apéndice 10.1 (Gen. Comp. Endocrinol.);  
4, 12-17, 19, 20, del apéndice 10.2 (submitted for  
publication).