



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ONTOGENIA Y REGULACION DE LA
GLANDULA INTERSTICIAL EN
EL OVARIO DE RATA INFANTIL

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARIA EUGENIA AGUILAR MENDOZA

Director de tesis: Dr. Horacio Merchant Larios
Instituto de Investigaciones Biomedicas UNAM

FALLA DE ORIGEN



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.

C O N T E N I D O

RESUMEN

ANTECEDENTES	1
I ELEMENTOS CONSTITUTIVOS DEL OVARIO	
II LA GLANDULA INTERSTICIAL	2
2.1 CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LAS CELULAS QUE CONFORMAN A LA GLANDULA INTERSTICIAL	2
2.2 ONTOGENIA DE LA GLANDULA INTERSTICIAL	4
2.2.1 FACTORES QUE CONTROLAN EL DESARROLLO DE LA GLANDULA INTERSTICIAL	5
III ESTEROIDOGENESIS	8
3.1 CONTROL DE LA ESTEROIDOGENESIS	11
3.2 CONTROL DE LA ESTEROIDOGENESIS <u>IN VITRO</u>	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
OBJETIVOS	15
MATERIALES Y METODOS	16
1. ORGANISMOS Y OBTENCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO	16
2. CULTIVO DE ORGANOS	16
3. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO	18
3.1 FIJACION, DESHIDRACION E INCLUSION	18
3.2 CORTE Y ANALISIS HISTOLÓGICO	19
4. DETECCION HISTOQUIMICA DE LA $\Delta 5$ 3β - HIDROXIESTERODE DESHIDROGENASA (HSDH)	19
RESULTADOS	21
1. DESCRIPCION ESTRUCTURAL E HISTOQUIMICA DE LOS OVARIOS OBTENIDOS <u>IN SITU</u>	21
2. DESCRIPCION ESTRUCTURAL E HISTOQUIMICA DE LOS OVARIOS TRATADOS <u>IN VITRO</u>	28
2.1 CULTIVOS EN MEDIO ESENCIAL	28
2.2 CULTIVOS SUPLEMENTADOS CON SUERO DE BOVINO FETAL (SBF)	30
2.3 CULTIVOS SUPLEMENTADOS CON GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (hCG)	32
2.4 CULTIVOS SUPLEMENTADOS CON GONADOTROPINAS CORIONICA HUMANA Y DE SUERO DE YEGUA PENADA (hCG-PMSG)	35
DISCUSION	36
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFIA	43

RESUMEN

En la presente investigación se estudiaron los efectos producidos en la glándula intersticial del ovario de rata infantil cuando éste es cultivado durante diez días en medio no suplementado (medio control), medio suplementado con suero de bovino fetal, medio suplementado con gonadotropina coriónica humana (hCG), y medio suplementado tanto con gonadotropina coriónica humana como con gonadotropina de suero de yegua preñada (hCG/PMSG).

Los resultados obtenidos demostraron que el tejido intersticial glandular se desarrolló y presentó actividad enzimática sólo cuando los cultivos se realizaron en medio suplementado con gonadotropina coriónica humana. Por lo tanto, se deduce que el desarrollo y diferenciación de esta glándula, depende de factores extragonadales.

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Dr. Horacio Merchant Larios por permitirme realizar el servicio social y la tesis en su laboratorio

A la M. en C. María del Carmen Uribe por aceptar ser tutor suplente en el presente trabajo y a las Doctoras Genoveva González y Elvira Estrada Flores quienes gentilmente revisaron esta tesis.

Al Dr. Jesús Manuel León Cázares por quien siento un profundo respeto.

A la Dra. Ma. Irma Villalpando Fierro por sus enseñanzas, asesorías e invaluable amistad.

Al fotógrafo José Avilés por su trabajo técnico.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Diana, Jesús, Martha Elva, Rebeca y Elenita, Maru Z y Arturo, Estela, Braulio, Martha Verónica, Marlene, Pueblito, José y Cielo, quienes me enseñaron el manejo del instrumental de laboratorio e hicieron sumamente agradable mi estancia en el Laboratorio.

A MI MADRE Y MI PADRE

A DAVID, RUBEN, NORA Y DIANA

A ALBERTO

A N T E C E D E N T E S

I ELEMENTOS CONSTITUTIVOS DEL OVARIO

De acuerdo con la clasificación propuesta por Duke (1978), el ovario del mamífero está integrado por folículos (ovocitos circundados por epitelio folicular y una lámina basal que lo separa del estroma) y por componentes no foliculares, entre los cuales podemos identificar los siguientes: epitelio superficial monoestratificado que rodea al ovario y se continúa con el peritoneo; el estroma, que comprende los elementos celulares de las tecas interna y externa, esta última principalmente compuesta por fibras de tejido conectivo y numerosos vasos sanguíneos que se localizan entre los folículos; el rete ovarii ó remanente de la conexión entre el mesonefros y la gónada; y las células del tejido glandular intersticial que Mossman y Duke (1973) definieron como "Cualquier célula de tipo glandular que se encuentra dentro del ovario, y que no forma parte ni de la glándula luteal, ni de la techal".

La primera referencia que se tiene sobre la existencia del tejido intersticial se remonta a 1863, año en el que Pflüger describió este tipo celular en el ovario de rata, y posteriormente, debido a sus características histológicas, Bouin en 1902 catalogó como células de la glándula intersticial.

II LA GLANDULA INTERSTICIAL

2.1 CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LAS CELULAS QUE CONFORMAN A LA GLANDULA INTERSTICIAL

Las células de la glándula intersticial del ovario de rata presentan características típicas de células sintetizadoras y secretoras de lípidos (Davies y Broadus, 1968; Motta, et al, 1970; Weisz y Gonsalus, 1973), como es el amplio desarrollo del retículo endoplasmático liso (Quattropani, 1973). Al cual se le considera como la marca estructural de toda célula que participa en la síntesis de lípidos (Leeson, 1963) y esteroides (Pudney, 1987). La cantidad y desarrollo del retículo endoplasmático liso se asocia con la concentración de enzimas esteroidogénicas presentes en él.

Además, se observan mitocondrias con crestas tubulares, lo cual sugiere una especialización relacionada con su función, ya que los túbulos confieren una mayor área de superficie por unidad de volumen que las crestas lamelares (Belt y Pease, 1956).

Las células de la glándula intersticial también contienen

inclusiones citoplásmicas de gotas lipídicas osmiofilicas y electrodensas, las cuales varían tanto en número como en dimensión, y representan un almacén de fosfolípidos, acetal-fosfolípidos, triglicéridos, residuos de ácidos grasos, colesterol y ésteres del colesterol (Tuckey, et al, 1984).

Otros orgánulos presentes en abundancia son los peroxisomas y dictiosomas (aparato de Golgi); los primeros, al parecer regulan la cantidad de colesterol intracelular y su utilización durante la esteroidogénesis. Este papel se les atribuye debido a que se ha observado un incremento en su número cuando se inhibe la síntesis de colesterol (Pudney, 1987). En tanto el aparato de Golgi está relacionado con el transporte intracelular de los diversos esteroides sintetizados. Es importante señalar que ambos orgánulos se encuentran en estrecha relación con el retículo endoplásmico liso.

Las células de la glándula intersticial frecuentemente están asociadas a vasos sanguíneos (De Groot, et al, 1957; Leeson, 1963; Ferguson, 1965) y a células del tejido conectivo que las rodean y las compartamentaliza, dandoles la apariencia de una glándula (Dahl, 1971). Una característica importante de la glándula intersticial es que su distribución, abundancia y diferenciación, se encuentran sujetas a variaciones rítmicas en correlación con la edad reproductiva y los ciclos ováricos (Mossman, et al, 1964; Motta, et al, 1970).

2.2 ONTOGENIA DE LA GLANDULA INTERSTICIAL

La glándula intersticial se encuentra bien desarrollada en los ovarios de roedores (Mori y Matsumoto, 1970). En éstos se ha observado que en las primeras etapas de vida posnatal, el estroma se caracteriza por presentar células mesenquimáticas, algunas de las cuales se diferenciarán hacia células precursoras de la glándula intersticial (Turner y Bagnara, 1971). Una vez que se han establecido las primeras células glandulares, su población se incrementa paulatinamente conforme avanza la edad del organismo (Hart, et al, 1966). Al inicio de la vida posnatal se le conoce como glándula intersticial primaria. En etapas posteriores del desarrollo, ésta es desplazada por otro tipo de tejido intersticial, al que se le denomina glándula intersticial secundaria, cuyo origen en los roedores se ha propuesto que es a partir de las células de la teca interna de folículos atrésicos (Taylor, 1961 ; Mossman, et al, 1964; Guraya, 1973; Mori y Matsumoto, 1970, 1973; Merchant, 1979; Merchant y Centeno, 1981).

La atresia folicular ocurre en cualquier momento de la vida del organismo, pero es particularmente evidente durante los primeros días de desarrollo posnatal, durante la atresia folicular algunas células de la teca interna que rodean al epitelio folicular se hipertrofian y forman pequeños acúmulos de células esteroidogénicas que se localizan en la región estromática.

En el ovario de rata el tejido intersticial primario se distingue de los demás tipos celulares alrededor de los 5 y 10

días posparto (dpp) (Rennels, 1951; Chieffi, et al, 1964; Presl, et al, 1965; Schlegel, et al, 1967; Weisz y Ferin, 1970; Weisz y Gonsalus, 1973; Quattropani y Weisz, 1973; Hoyer y Byskov, 1981). Hasta la tercera semana de vida posnatal es el único componente ovárico que posee características asociadas con las células esteroidogénicas (Dawson y McCabe, 1951). Así, la producción de esteroides durante éste periodo se debe exclusivamente a la actividad de las células de la glándula intersticial primaria "cuyo desarrollo es gradual y parte desde las regiones interfoliculares hacia el folículo" (Quattropani, 1973).

2.2.1 FACTORES QUE CONTROLAN EL DESARROLLO DE LA GLANDULA INTERSTICIAL

Los principales factores a considerar que intervienen en el control del desarrollo de la glándula intersticial son:

- a) La unidad folicular (Mandel, 1935)
- b) las células germinales (Merchant, 1975; 1976) y,
- c) las gonadotropinas circulantes (Quattropani y Weisz, 1973).

a) En 1935 Mandel demostró que el desarrollo de la capacidad esteroidogénica en el ovario de rata, dependía de la presencia de la unidad folicular, puesto que cuando ocasionó destrucción folicular absoluta, mediante el uso de radiaciones, ninguna actividad estrogénica se detectó.

b) Posteriormente, Merchant (1975; 1976) y Merchant y Centeno (1981), trabajaron con ratas tratadas con busulfán (droga que destruye selectivamente a las Células Germinales Primordiales-CGP-) y una cepa de ratón mutante estéril, y encontraron que la presencia de los ovocitos en los ovarios parece ser necesaria para la formación de folículos y consecuentemente para la diferenciación estructural de las células secretoras de esteroides.

De tal manera que, la presencia de células germinales primordiales en el ovario, induce la foliculogénesis y como consecuencia del proceso de atresia folicular se inicia la diferenciación del tejido intersticial glandular.

Recientemente Felloux y col (1988), confirmaron las observaciones anteriores al corroborar que al inyectar busulfán a ratas gestantes, los productos presentaban una reducción en el número de células germinales y folículos; además observaron cierta disminución en la producción de estrógenos y en la actividad enzimática de la aromatasa y de la $\Delta 5$ 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSDH).

Con respecto a la acción de la unidad folicular sobre el desarrollo del tejido intersticial glandular, se ha encontrado que casi ningún esteroide sexual es producido por el ovario antes de la formación de los folículos (Byskov y Hoyer, 1988), Estos se identifican desde el primer día posparto en la rata (Stein y Anderson, 1981); y conforme aumenta su número, también se incrementa la cantidad de tejido intersticial (Mandel, 1935).

c) Numerosas investigaciones (Levy y col, 1959;

Crumeyroлле-Arias y Aschheim, 1976; Ireland y Richards, 1978; Eckstein y Ravid, 1980; Funkenstein y col, 1980; Peluso, 1989), han demostrado que tanto la diferenciación posnatal de las células que integran al tejido intersticial glandular, como su estado de funcionalidad, dependen de la presencia de gonadotropinas hipofisarias [Hormona Luteinizante (LH) y Hormona Foliculo Estimulante (FSH)]. No obstante, el papel exacto de éstas sobre el inicio de la diferenciación del tejido intersticial se desconoce. Una de las primeras evidencias al respecto, fue dada por Rennels en 1951, quien demostró que los andrógenos secretados por el ovario de rata bajo la influencia de gonadotropinas exógenas, eran producidos por las células del tejido intersticial glandular, las cuales, como respuesta a estas hormonas, se diferenciaban y evidenciaban cambios citológicos (membranogénesis), histológicos [(aumento global del tamaño del ovario, generalmente atribuido al incremento en la cantidad de tejido intersticial (Pavic, 1963; Davenport y Mallette, 1966; Lunn y Loraine, 1973)] y bioquímicos (aumento en la capacidad esteroidogénica del tejido), mismos que actualmente se asocian a una acelerada producción de hormonas esteroides (Guraya, 1973).

Sin embargo, dicha estimulación exógena no puede realizarse antes del nacimiento, puesto que es hasta la vida posnatal cuando la hipófisis inicia su producción de gonadotropinas (LH y FSH) (Döhler y Wutke, 1974; Chowdhury y Steinberger, 1976).

I I I ESTEROIDOGENESIS

La esteroidogénesis ó formación de esteroides, se realiza a partir del colesterol, precursor obtenido de alguna de sus tres fuentes principales, a saber:

- a) Colesterol preformado tomado de la sangre
- b) Colesterol preformado y almacenado dentro de la célula.
- c) Colesterol sintetizado de novo dentro de la célula a partir de acetato.

Este precursor es desdoblado mediante una serie de enzimas, hasta transformarlo en pregnenolona, la cual es una intermediaria común a todas las clases de hormonas esteroides producidas tanto por los ovarios cómo por otros tipos de órganos esteroidogénicos (Gore-Langton y Armstrong, 1988). Esta es, a su vez, convertida a progesterona por el complejo enzimático $\Delta 5$ 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa ($\Delta 5$ 3β -HSDH) (1.1.1.145.): $\Delta 5$ -4 cetoesteroide isomerasa ($\Delta 5$ -4 KSI) (5.3.3.1.), cuya función es la transformación irreversible (en condiciones fisiológicas) de $\Delta 5$ 3β - hidroxiesteroides a $\Delta 5$ 3 cetoesteroides (emplean NAD+ como aceptor de electrones). Esta vía de síntesis de esteroides es común para todos los vertebrados (Rubin, et al, 1963; Davies et al, 1966; Haffen, 1970; Collenot y Collenot, 1977).

En los mamíferos, existen dos vías de biosíntesis de esteroides, comunmente conocidas como: vía Δ -4 y viá Δ -5, la

primera emplea 17 α hidroxiprogesterona, mientras que la segunda inicia su ruta metabólica mediante el uso de 17 α hidroxipregnenolona, esta última es la vía más empleada.

Dicho complejo no sólo transforma pregnenolona a progesterona, sino también 17 α -hidroxipregnenolona a 17 α -hidroxiprogesterona y dehidroepiandrosterona a androstendiona; éstas dos últimas conforman la cadena de derivados esteroidogénicos que finaliza con la producción de estrona, testosterona y estradiol en el ovario (FIG 1).

La actividad del complejo enzimático es indispensable para llevar a cabo la producción de hormonas esteroides, por lo que se le considera como un marcador fisiológico precoz de las células esteroidogénicas, el cual a su vez, está influenciado por la edad, el sexo, los fenómenos cíclicos, la dieta, el "estrés", entre otras (Baillie, et al, 1966; Goldman, et al, 1972; Chandrashekar y Leathem, 1977).

Los primeros indicios de actividad esteroidogénica localizada mediante técnicas histoquímicas, en el ovario del mamífero se advierten en las células intersticiales localizadas en la región medular (Lombard y Scheib, 1972; Hoyer y Byskov, 1981). La edad de aparición depende de la especie en estudio. En el caso de la rata, se ha demostrado que el ovario in situ es capaz de sintetizar esteroides desde los primeros días de vida posnatal (Rennels, 1951; Chieffi, et al, 1964; Presl, et al, 1965; Schlegel, et al, 1967; Presl, et al, 1969; Weisz y Ferin, 1970; Weisz y Gonsalus, 1973; Hoyer y Byskov, 1981), edad en la cual el tejido intersticial inicia su diferenciación. La producción de esteroides aumenta con el

incremento de la actividad enzimática hasta obtener un máximo a partir de la segunda semana de vida posnatal (8 a 10 dpp) (Presl, et al, 1965; Schlegel, et al, 1967). En esta edad el ovario de la rata inicia la producción activa de esteroides (Smeaton, et al, 1975; Funkenstein, et al, 1980) y la actividad histoquímica esteroidogénica es evidente (Picon, et al, 1988).

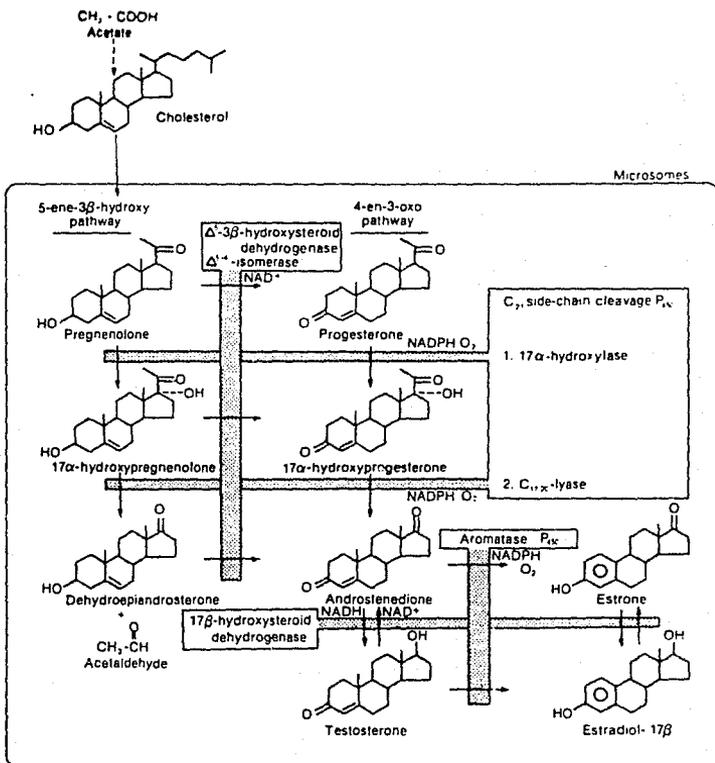


FIG 1 Principales rutas metabólicas en los microsomas obtenidos del ovario de mamífero para la producción de Progesterona, Andrógenos y Estrógenos [Gore-Langon, RE y Armstrong, DT 1988. En: The Physiology of Reproduction 1988 (Knobil E y Neill J eds.) pag. 335].

3.1 CONTROL DE LA ESTEROIDOGENESIS

Se ha observado que el almacenamiento y utilización del colesterol en el ovario de los mamíferos, está directamente influenciado por las gonadotropinas hipofisiarias y fundamentalmente por la LH/hCG (gonadotropina coriónica humana) (Guraya, 1975), la cual facilita la esteroidogénesis. Esta se evidencia por el incremento en la actividad enzimática en los ovarios de rata, así como por la agilización del transporte del colesterol que se encuentra almacenado en las gotas lipídicas (las cuales desaparecen del tejido intersticial poco después del tratamiento con hCG) hacia las mitocondrias o sitios de su utilización [Guraya y Greenwald, 1964 (rata, hamster, conejo y cuyo); Channing y Tsafiriri, 1977; Tuckey, et al, 1984; Gore-Langton y Armstrong, 1988).

Los trabajos de Levy y col (1959), Presl, et al, (1965), Crumeyrolle-Arias y Aschheim, (1976) y Burden y Lawrence (1977) entre otros, mostraron que en ratas hipofisectomizadas, las gonadotropinas hipofisiarias juegan un papel muy importante en la diferenciación bioquímica del tejido intersticial glandular.

Una vez realizada la hipofisectomía, la actividad del complejo enzimático $\Delta 5 \beta$ hidroxisteroide deshidrogenasa : $\Delta 5-4$ cetoesteroide isomerasa desaparece por completo.

En ratas hipofisectomizadas y simultáneamente tratadas con gonadotropinas exógenas, la actividad enzimática es similar a la encontrada en las ratas control.

La investigación realizada por Kent y Ryle (1975), señala

que el tejido intersticial sólo es estimulado por LH y hCG, mas no por la FSH. Sin embargo, los estudios realizados por Susuki y col (1978) sugieren que a su vez, la FSH posee cierta capacidad para inducir esteroidogénesis, puesto que cuando se suministra en forma de PMSG (gonadotropina de suero de yegua preñada), la actividad enzimática de la $\Delta 5$ 3β hidroxiesteroide deshidrogenasa y de la 17β hidroxiesteroide deshidrogenasa se incrementa (Eckstein y Ravid, 1980).

En el caso del tejido ovárico de conejo (Younglai y Borgmann, 1988) y de oveja (Moor, 1973), éste se vuelve esteroidogénicamente activo cuando los niveles de gonadotropinas se elevan, y se inicia así la producción de hormonas esteroides. Aparentemente, el ovario de rata sólo puede responder a la presencia de gonadotropinas exógenas hasta poco después de la primera semana de vida (Funkenstein y Nimrod, 1981).

3.2 CONTROL DE LA ESTEROIDOGENESIS IN VITRO.

En cultivo de órganos, los ovarios de ratas fetales e infantiles, muestran que en presencia de dehidroepiandrosterona, hay una cierta producción de estradiol y de otras hormonas esteroides desde los 13 a 14 días de gestación (dg) (Picon, 1985). Por lo tanto se sugiere que la actividad $\Delta 5$ 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa se encuentra presente en las gónadas fetales femeninas. Además, se ha observado que la adición de hormona luteinizante (LH) a cultivos de ovarios de ratas neonatales e infantiles, ocasiona

un incremento considerable en la producción y secreción de esteroides (Ireland y Richards, 1978; Brawn y Tsafiriri, 1980; Funkenstein, et al, 1980), así como en la actividad del complejo enzimático $\Delta 5 \beta$ HSDH: $\Delta 5-4 \beta$ KSI (Goldman y Kohn, 1970).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Puesto que la mayoría de las investigaciones concernientes al desarrollo y capacidad esteroideogénica de la glándula intersticial en ovarios de rata in vitro, se han realizado en organismos púberes a adultos (en los cuales no sólo se estimula a las células intersticiales, sino también a aquellas que forman parte de la unidad folicular), decidimos estudiar los efectos sobre la actividad enzimática esteroideogénica y el desarrollo de la glándula intersticial cuando ambos ovarios se extraen de individuos infantiles y se mantienen organotípicamente en medio de cultivo esencial, con suero de bovino fetal (medio control), con gonadotropina coriónica humana y con gonadotropinas coriónica humana y de suero de yegua preñada.

O B J E T I V O S

1) Establecer la edad postnatal en la cual puede detectarse la diferenciación histoquímica del tejido esteroideogénico en el ovario de la rata.

2) Determinar el efecto del suero y de las gonadotropinas coriónica humana (hCG) y de suero de yegua preñada (PMSG), en el establecimiento y diferenciación del tejido intersticial de la rata mantenido en cultivo de órganos, para evidenciar la necesidad de señales exógenas.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

1. ORGANISMOS Y OBTENCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

En el presente estudio se emplearon ratas Wistar de 0 a 15 días posparto (dpp) (se consideró el día de nacimiento como día cero posparto), las cuales fueron sacrificadas mediante dislocación cervical o decapitación, para posteriormente lavarlas con solución antiséptica de Benzal - Alcohol 70 % en proporción 1:1. En condiciones estériles se procedió a exponer la cavidad abdominal para disectar ambos ovarios y procesarlos de acuerdo con las siguientes técnicas:

2. CULTIVO DE ORGANOS

Bajo condiciones de asepsia y dentro de una campana de flujo laminar, los ovarios se aislaron y se colocaron en portaobjetos triescabados con medio Leivobitz - 15 (L-15, GIBCO), posteriormente se cultivaron organotípicamente (de acuerdo al procedimiento descrito por Byskov y Saxén, 1976) en cajas de petri de 35 mm con:

- a) 3 ml de Medio McCoy 5a modificación (MICROLAB); 200 µg/ml de penicilina y 200 U/ml de estreptomycin como antibióticos, a este medio se le denominó medio no suplementado o esencial.
- b) Medio esencial suplementado con 10 % de suero de bovino fetal (SBF), al cual se le denominó medio control. Se empleó con el objeto de determinar si alguno de los factores que se encuentran en el suero pudiera tener cierta relación con el desarrollo y diferenciación de la glándula intersticial.
- c) Medio esencial suplementado con 25 unidades internacionales (UI) de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) (GONADOTROPYL -C, LABORATORIO ROUSSELL)/ml de medio.
- d) Medio esencial suplementado con 25 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) y 5 UI de Gonadotropina de suero de Yegua Preñada (PMSG) [Follitropina]/ ml de medio.

Con el objeto de discernir si la glándula intersticial se encuentra controlada por factores hormonales exógenos, se decidió emplear primeramente un cultivo con gonadotropina coriónica humana (hCG) y posteriormente uno con ambas gonadotropinas (hCG-PMSG).

Los cultivos se incubaron en una estufa a 37°C, con 100 % de humedad y una atmósfera de 95 % de aire y 5 % de dióxido de carbono durante 2, 5 o 10 días, se realizaron cambios de medio cada tercer día.

3. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA (ME):

3.1 FIJACION, DESHIDRATAACION E INCLUSION

Tanto los ovarios obtenidos in situ como los cultivados, se sumergieron en fijador de Karnovsky (1965) sin calcio, 0.1 M pH 7.2 a 7.4, durante 2 horas, se lavaron en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2 a 7.4 durante 15 minutos, se postfijaron con tetraóxido de osmio durante 1 a 2 horas (Zetterqvist, 1956) y se lavaron varias veces con agua destilada para posteriormente deshidratarlos por periodos de 20 minutos, con alcoholes graduales de 70, 80, 90, 95, y dos cambios de 100 %.

Las muestras se incubaron en óxido de propileno durante 20 minutos (dos veces), se preincluyeron en mezclas de óxido de propileno y epón 812 (proporción 1:1 durante 2 horas y 1:3 durante 2 horas), hasta emplearse únicamente epón 812 durante 15 hrs.

Finalmente, se incluyeron en epón 812 (Luft, 1961) durante 24 horas en una estufa a 60°C.

3.2 CORTE Y ANALISIS HISTOLOGICO

Los bloques que contenían el material biológico, fueron cortados en un ultramicrotomo MT-1 (SORVALL), para obtener cortes semifinos de 1 a 2 μ m de espesor que se tñeron con azul de toluidina (0.5 %), se contrastaron con etanol al 96 % y se montaron con bálsamo de Canadá en portaobjetos para su observación a microscopia de luz de alta resolución.

4. DETECCION HISTOQUIMICA DE LA AS 3 β - HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA (HSDH)

Esta técnica, inicialmente descrita por Levy y col (1959), se emplea para determinar la localización, el tiempo de aparición y la abundancia de enzimas y otros compuestos relacionados con el metabolismo de los esteroides. En esta investigación la técnica fue aplicada a los ovarios in situ e in vitro, los cuales fueron incluidos en cápsulas BEEM de plástico, con resina Tissue-tak. Dicho material se congeló -70 °C sumergido en hexano, que se encontraba sobre una mezcla de hielo seco y acetona. En un crióstato, se obtuvieron cortes de 6 a 8 μ m de espesor, que fueron montados sobre laminillas cubiertas con gelatina y guardados en refrigeración durante 24 horas al vacío. Posteriormente se incubaron a 37 °C con el medio control [20 mg de Nicotinamida Dinucleótido (NAD⁺) y 20 ml de amortiguador Tris 0.2M a pH 7.6] o con el medio de detección [20 mg de Nicotinamida Dinucleótido (NAD⁺), Sigma; 10 mg de Nitroblue Tetrazolium (NBT) Grado III; 20 ml de

amortiguador Tris 0.2 M a pH 7.6 y 2 mg de Dehidroisoandrosterona (DHEA)] durante 30 a 40 minutos. Después de la incubación las laminillas se lavaron con agua destilada, se fijaron durante 10 minutos en formalina neutra a temperatura ambiente y posteriormente se sumergieron varias veces en amortiguador Tris a pH 7.6, se tiñeron con una solución acuosa de verde de metilo al 1% durante un minuto, se lavó el exceso de colorante con agua destilada y se montaron en glicerol para posteriormente ser observadas y fotografiadas en un microscopio ULTRAPHOT II (ZEISS).

La demostración de la actividad enzimática depende de la transferencia de hidrógenos del hidroxisteroide a la sal de tetrazolio, vía un nucleótido de piridina (NAD^+), de esta manera la sal se reduce y, puesto que la forma reducida es insoluble y coloreada (sal de formazán), se deposita en el sitio de la reacción dando la localización de ésta (FIG.2).

La cantidad de formazán depende tanto de la actividad oxidativa de la enzima, como del sistema diaforasa (Robinson, et al, 1971), cuya localización ocurre en el tejido intersticial (Kent y Ryle, 1975).

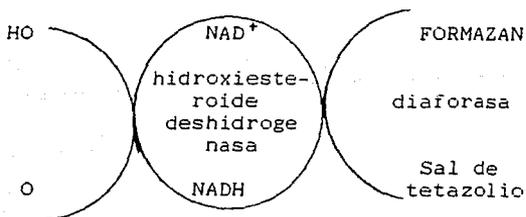


FIG.2 Diagrama de la reacción histoquímica que detecta la actividad enzimática de la A5 3B HSDH.

R E S U L T A D O S

1. DESCRIPCION ESTRUCTURAL E HISTOQUIMICA DE LOS OVARIOS OBTENIDOS IN SITU.Ovario de rata recién nacida, 1, 2 y 3 dpp:

El ovario de rata recién nacida presentó una gran cantidad de cordones ováricos dentro de los cuales se observaron numerosos ovocitos, algunos de los cuales presentaban signos claros de degeneración celular.

Los ovocitos fueron fácilmente identificados debido a su gran tamaño, forma esférica, núcleo prominente y nucleolo conspicuo. Con microscopia electrónica además se pueden observar numerosas mitocondrias y abundantes ribosomas libres (Zamboni y Merchant, 1973).

A esta edad el estroma se caracterizó por ser muy laxo y poseer células fusiformes; no se observaron las células del tejido intersticial glandular y la reacción a la $\Delta 5 \beta$ HSDH fue negativa.

Con respecto al ovario de rata de 1 dpp, en éste se observó una mayor invasión y proliferación por parte del tejido estromático (mesénquima, fibroblastos, vasos sanguíneos, etc) hacia los cordones ováricos. Este cambio histológico coincidió

con un incremento en la fragmentación de los cordones ováricos y con ello aumentó el número de folículos primordiales en la región medular (FIG 3).

Hacia los 2 y 3 dpp el proceso de crecimiento folicular continúa de una manera gradual desde la región medular hacia la corteza, se estableció así un gradiente de desarrollo de los folículos primordiales. Sin embargo a esta edad no se observó reacción alguna que evidencie la actividad de la enzima Δ^5 3β HSDH (FIG 4).



FIG 3 Corte semifino del ovario de rate de 1 dpp en el que se observan numerosos cordones ováricos (Co) en cuyo interior se aprecian ovocitos en estrecha asociación. Además encontramos los primeros folículos primordiales (f) (160X).

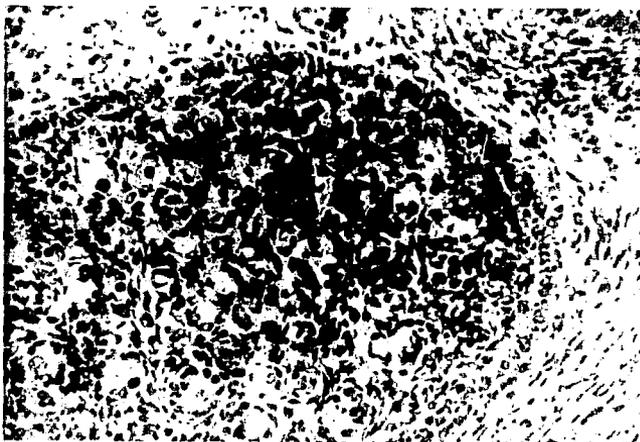


FIG 4 Ovario de rata de 3 dpp al que se le aplicó la técnica histoquímica, el resultado fue negativo (40X).

Ovario de rata 4 dpp

La histología del ovario no permitió la identificación de células esteroidogénicas. Sin embargo, la técnica histoquímica, hizo posible evidenciar, mediante el precipitado de formazán, cierta actividad esteroidogénica en células, o pequeños grupos de células, localizados interfolicularmente hacia la región medular; región del ovario donde se lleva a cabo la formación y desarrollo de los primeros folículos (FIG 5A y 5B).



FIG 5A Reacción histoquímica en el ovario de rata in situ a los 4 dpp, en el cual son fácilmente reconocibles los folículos (f) hacia la región medular donde se perciben las primeras reacciones de precipitación (flecha) (40%).

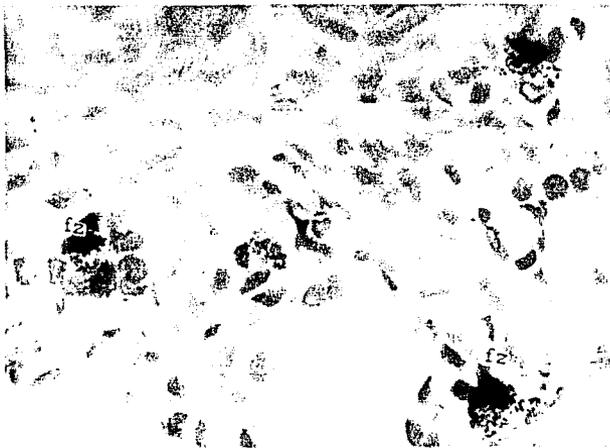


FIG 5B Reacción histoquímica positiva en el ovario de rata infantil in situ a los 4 dpp; visto a mayor aumento el ovario presenta células con depósitos de formazán (fz) (160X).

Ovario de rata 5 dpp

La región medular en ovarios de 5 dpp mostró un evidente crecimiento folicular, puesto que las células foliculares formaron varias capas alrededor de los ovocitos (folículos preantrales). La actividad de la $\Delta 5$ 3β HSDH se incrementó a esta edad.

Ovarios de rata de 10, 12 y 15 dpp

A los 10 días posparto se observó que la cantidad de folículos preantrales y antrales fue mayor; como lo fueron los numerosos acúmulos de células del tejido intersticial glandular en las inmediaciones de los folículos, las cuales evidenciaron una clara actividad enzimática de la $A5\ 3\beta\ HSDH$.

A los 12 dpp el ovario presentó en su mayoría ovocitos que se encontraron formando parte de folículos preantrales. Además hubo varios folículos que presentaron un evidente antro folicular. En estos últimos existió una clara distinción entre los tres principales tipos celulares: granulosa, tecas y las células que forman al tejido intersticial glandular. Este último formó masas de tamaño considerable alrededor de los folículos más desarrollados, cuya reacción a la técnica histoquímica fue muy evidente.

Finalmente, el ovario de rata de 15 dpp incluía numerosos folículos antrales entre los cuales fueron fácilmente distinguibles las tecas y el tejido intersticial glandular. En cortes semifinos de ovarios incluidos en epón, se observó que los folículos se encontraban rodeados por grupos de células sumamente conspicuas debido a la metacromacia ocasionada por las gotas lipídicas localizadas en su interior (FIG 6A). Cuando se les realizó la prueba histoquímica, estas células presentan una clara reacción a la $A5\ 3\beta\ HSDH$ (FIG 6B). Por lo que las células metacromáticas observadas en cortes semifinos corresponden a la glándula intersticial del ovario.

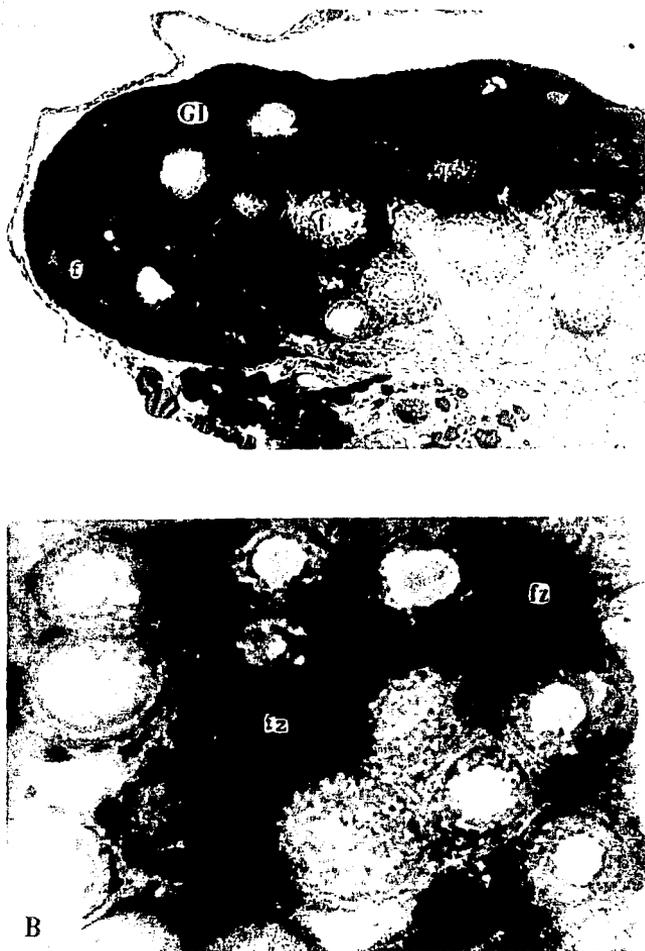


FIG 6 Ovario de rata in situ de 15 dpp. A) Histología del ovario en el cual se observan folículos (f) rodeados por masas de glándula intersticial (GI) que muestran una B) reacción histoquímica muy evidente, localizada mediante los depósitos de formazán (f2)(30X).

2. DESCRIPCION ESTRUCTURAL E HISTOQUIMICA DE LOS OVARIOS TRATADOS IN VITRO.

2.1 CULTIVOS EN MEDIO ESENCIAL.

Los cultivos de ovarios de rata de 1, 3 y 5 dpp + 10 días de cultivo (dc) en medio esencial, mostraron un marcado retraso en el desarrollo de las numerosas capas de células foliculares que suelen cubrir al ovocito con respecto a los ovarios de 10 dpp in situ (etapa a la cual correspondería el cultivo). Los primeros presentaron escasas capas de células foliculares que rodearon al ovocito, e incluso aún llegaron a presentarse grupos de ovocitos unidos entre sí (cordones ováricos). Con respecto a la presencia de células intersticiales, éstas no se observaron ni en cortes semifinos ni con la técnica histoquímica. Cuando el cultivo de ovarios se inició a los 5 dpp, se observó a microscopía de luz un número importante de folículos preantrales localizados predominantemente hacia la región cortical cuyos ovocitos se encontraron bastante desarrollados (FIG 7). Sin embargo, algunos de estos folículos mostraron diversos grados de degeneración celular, la cual fue sumamente evidente en la región medular (FIG 7). Es importante señalar que entre los folículos en desarrollo no se apreció la reacción positiva ocasionada por la actividad enzimática (FIG 8).

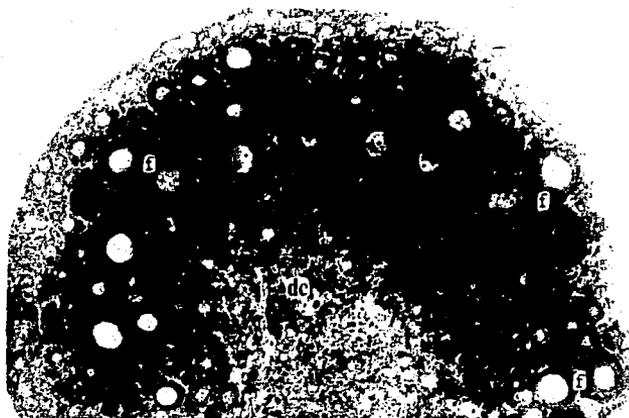


FIG 7 Ovario de rata de 5 días posparto cultivado durante 10 días en medio esencial. Histología del cultivo donde se muestra claramente los folículos (f) en desarrollo en la corteza y la evidente degeneración celular (dc) (100X).



FIG 8 Cultivo de ovario de rata de 5 dpp durante 10 días en medio esencial. Reacción histoquímica negativa a la $\Delta 5 \ 3\beta$ HSDH (40X).

2.2 CULTIVOS SUPLEMENTADOS CON SUERO DE BOVINO FETAL (SBF).

Cuando los ovarios fueron cultivados 10 días a partir del 5o día posparto en medio esencial suplementado con suero de bovino fetal (5 dpp + 10 dc c/SBF) no se encontraron variaciones notables con aquellos ovarios cultivados en medio esencial. Así la actividad de la $\Delta 5 \ 3\beta$ HSDH fue negativa y se detectó una degeneración celular muy acentuada (FIG 9A y B).

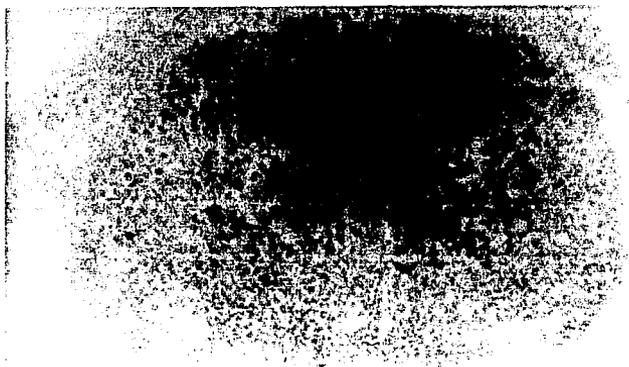
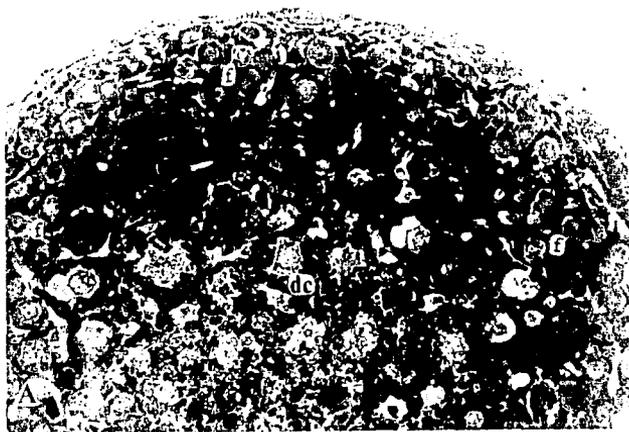
**B**

FIG 9 Ovario de rata de 5 días posparto cultivado durante 10 días en medio esencial suplementado con suero de bovino fetal (SBF). A) Aspecto histológico donde se muestran los folículos (f) escasamente desarrollados y la degeneración celular (dc) en la zona medular (80X). B) reacción histoquímica negativa (40X).

2.3 CULTIVOS SUPLEMENTADOS CON GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA (hCG).

En los cultivos de ovarios de 1 y 3 días posparto con gonadotropina coriónica humana (hCG) durante 10 días (1 y 3 dpp + 10 dc), se observó poco desarrollo folicular, esto es, ovocitos rodeados por una o dos capas de células foliculares fusiformes, los cuales se encontraron localizados tanto en la región medular como en la corteza del ovario, algunos de estos folículos presentaron claros indicios de degeneración celular. El tejido intersticial no se observó a microscopía de luz ni con las técnicas de histoquímica.

En los ovarios de 3 dpp, se observó que la mayor parte de los ovocitos se encontraban rodeados por una o dos capas de células foliculares que en ciertos casos llegaron a ser numerosas y de apariencia cúbica. Precisamente alrededor de estos folículos más desarrollados es donde se encontraron las escasas células esteroideogénicas capaces de producir cierta respuesta positiva a la técnica histoquímica empleada.

Los gránulos de formazán se localizaron tanto en la zona intersticial alrededor de los folículos, como en las propias células foliculares en el caso de folículos atresicos.

De manera similar a los cultivos realizados en medio esencial, los ovarios de 5 días de edad cultivados por espacio de diez días con gonadotropina coriónica humana (5 dpp + 10 dc c/hCG) presentaron un claro desarrollo folicular hacia la región cortical. En cortes semifinos se identificaron fácilmente los lípidos intracelulares gracias a la metacromasia característica de éstos (FIG 10).

La reacción a la Δ^5 3β HSDH fue mucho más evidente que aquella observada en los cultivos de 3 dpp + 10 dc c/hCG. Se presenta igualmente en la zona intersticial y en las células de la granulosa tanto de folículos en desarrollo, como de aquellos que mostraron diversos grados de atresia (FIG 11).

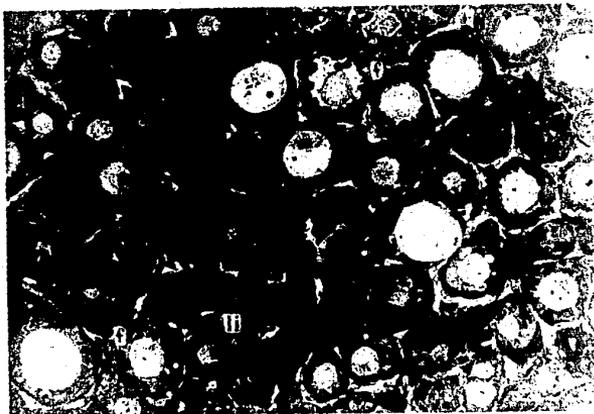


FIG 10 Ovario de rata de 5 dpp cultivado 10 días en medio suplementado con gonadotropina coriónica humana. Histología del cultivo, en el cual se observan numerosos folículos en desarrollo (f) y cierta metacromasia ocasionada por los lípidos intracelulares (li) (80X).

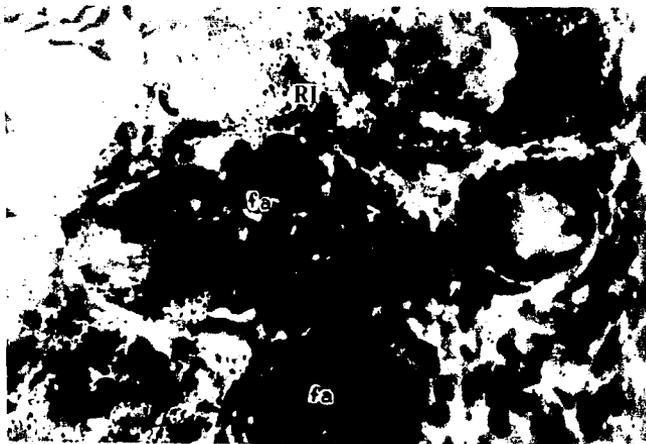


FIG 11 Reacción enzimática positiva a la enzima AS 3 β HSDH en un ovario de 5 dpp cultivado durante 10 días en medio esencial suplementado con gonadotropina coriónica humana (hCG). Se observan depósitos de formazán en la región intersticial (RI) y en folículos atrésicos (fa)(80X)

2.4 CULTIVOS SUPLEMENTADOS CON GONADOTROPINAS CORIONICA HUMANA Y DE SUERO DE YEGUA PRENADA (hCG/PMSG).

Cuando además de la hCG se agregó gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) (5 dpp + 10 dc c/(hCG-PMSG)), el resultado que se obtuvo fue un crecimiento acelerado de los folículos. De manera que fue posible encontrar células foliculares en mitosis (FIG 12A). Por otra parte, la actividad enzimática detectada mediante el depósito de formazán, no difiere de la encontrada en los cultivos que se realizaron sólo con gonadotropina coriónica humana (FIG 12B).

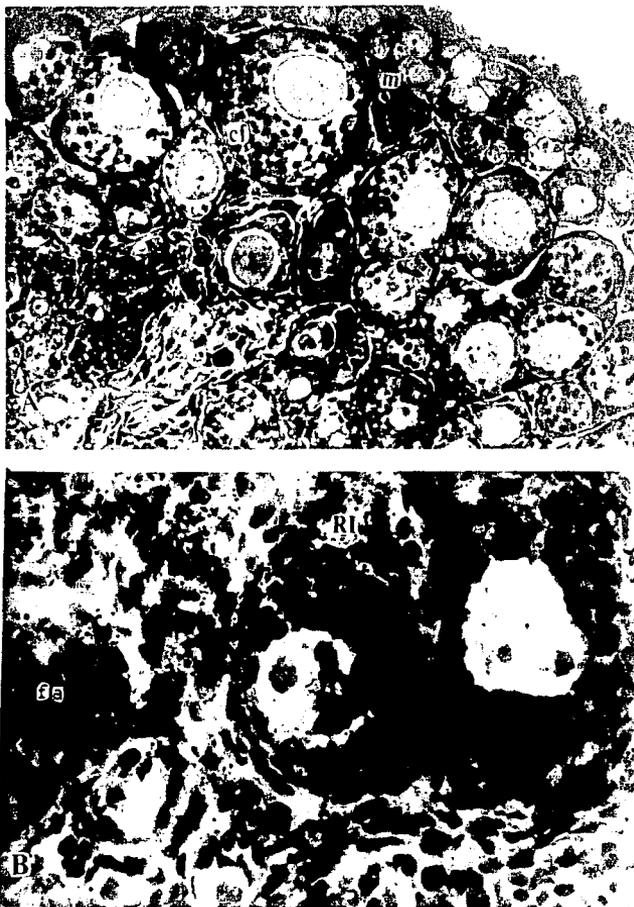


FIG 12 Ovario de 5 dpp cultivado 10 días en medio suplementado con gonadotropinas coriónica humana y de suero de yegua preñada (hCG-PMSG). A) Histología del cultivo en el que se muestra el evidente desarrollo de las células foliculares (cf), una de las cuales se encuentra en mitosis (m)(60X). B) Reacción ezimática positiva a la enzima 45β HSDH en la región intersticial (RI) y folículos atrésicos (fa) (100X).

D I S C U S I O N

En cultivos de ovarios en medio esencial sin suero, se observó un marcado decremento en el número de células foliculares que rodean al ovocito, sobre todo en aquellos ovarios que fueron cultivados a partir de edades tempranas (1 y 3 dpp). Esta observación indica que es necesaria la presencia de factores del suero que promuevan el desarrollo folicular en el ovario infantil.

Los ovarios cultivados a los 5 dpp, presentaron signos de degeneración celular hacia la región medular, cosa que fue raro encontrar en los cultivados a 1 y 3 dpp. Como al avanzar la edad del individuo se incrementa el tamaño ovárico, dicha degeneración puede explicarse por la dificultad para el libre tránsito de gases, nutrimentos y sustancias de desecho metabólico, que padecen los órganos en cultivo a partir de un tamaño crítico. Esto explica porqué contrariamente a los ovarios in situ, en los ovarios cultivados los folículos más desarrollados se localizaron hacia la corteza ovárica, sitio donde fácilmente se lleva a cabo el intercambio.

Pavic en 1963 cultivó ovarios de rata de 8 días posparto en presencia de gonadotropina coriónica humana (hCG), y observó

mediante técnicas histoquímicas un aumento considerable en la reacción a la 5β -HSDH. Posteriormente, Smeaton y col (1975), con técnicas bioquímicas observaron un máximo en la producción y secreción de esteroides cuando agregaron hCG a los cultivos de ovarios de ratas de 8 y 12 días posparto. Nosotros encontramos que la reacción histoquímica de la 5β -HSDH, es cada vez más evidente conforme aumenta la edad de la rata de la que se toma el ovario. Se puede concluir entonces, que la edad del individuo es un factor muy importante para que se lleve a cabo la diferenciación del tejido intersticial in vitro en presencia de gonadotropinas.

En el presente trabajo encontramos que desde el 49 día de vida posnatal, en el ovario in situ existen algunas células que poseen actividad enzimática de la 5β -HSDH. Sin embargo; la actividad se pierde al cultivar estos ovarios durante 10 días en ausencia de gonadotropinas. Parece entonces, que la presencia de gonadotropinas es necesaria tanto para inducir como para mantener la diferenciación de las células esteroidogénicas y con ello la producción de enzimas relacionadas con este proceso. Así, al iniciar el cultivo con ratas cada vez de mayor edad, la cantidad de células esteroidogénicas aumenta. De tal manera que las gonadotropinas mantienen e inducen un número mayor de células intersticiales en los ovarios in vitro, que dan por consiguiente una mayor respuesta histoquímica.

Además de los cultivos de 10 días arriba mencionados, también trabajamos con otros de corto plazo (5 días posparto durante 2 días de cultivo), en los que tratamos de determinar

en qué momento se perdía la capacidad esteroidogénica ya adquirida in situ. Como la prueba histoquímica resultó negativa, se demuestra que la actividad de esta enzima en los ovarios mantenidos en cultivo organotípico, requiere de la presencia de gonadotropinas a partir de una edad determinada.

Este estudio corrobora el trabajo de Funkenstein y col (1980), quienes al trabajar con ovarios de ratas recién nacidas, propusieron que la gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG), sólo intervenía en el desarrollo y multiplicación de las células foliculares, mas no en la diferenciación de la glándula intersticial.

Numerosas investigaciones demuestran que la edad en la que aparece la actividad histoquímica de la enzima $\Delta 5$ 3β -HSDH en los ovarios de la rata, es aproximadamente entre los 5 y 10 días posparto (Rennels, 1951; Chieffi, et al, 1964; Presl, et al, 1965; Schlegel, et al, 1967; Weisz y Ferin, 1970; Weisz y Gonsalus, 1973; Quattropiani y Weisz, 1973). Sin embargo, en la presente investigación detectamos dicha actividad desde el cuarto día, lo cual difiere con la edad reportada previamente. Como la técnica histoquímica empleada por nosotros es básicamente la misma, la diferencia con nuestros resultados podría deberse a la cepa de ratas que se emplean en diferentes laboratorios. Por ejemplo, los estudios en los que se emplean ratas Wistar (Rennels, 1951; Presl, et al, 1965) reportaron la actividad esteroidogénica desde los 5 días posparto, un día posterior a lo registrado en nuestro trabajo. En los estudios que utilizan ratas Sprague-Dawley la actividad esteroidogénica se encuentra entre los 7 a 10 días posparto (Chieffi, et al,

1964; Weisz y Ferin, 1970; Quattropani y Weisz, 1973). Por lo tanto, parece que en las ratas pertenecientes a la cepa Sprague-Dawley la diferenciación de la glándula intersticial se lleva a cabo más tardíamente que en las ratas Wistar empleadas en esta investigación. Además, la diferencia cronológica podría deberse a que Rennels (1951) y Presl y col (1965), no señalan cómo inician el conteo de la edad. Nosotros consideramos el día de nacimiento como día cero posparto, y tal vez ellos lo consideren como día uno posparto. Con lo cual, no habría diferencia entre nuestros resultados y los obtenidos por estos investigadores.

Los estudios que emplean métodos bioquímicos, han detectado la actividad de la 5 β -HSDH en ratas fetales y neonatales (Schlegel, et al, 1967; Quattropani y Weisz, 1973; Smeaton, et al, 1975; Picon, et al, 1988). Como la técnica empleada en estos últimos estudios se basó en el uso de precursores marcados con radioactividad, aparentemente dicha técnica es mucho más sensible para detectar la actividad de esta enzima que la técnica histoquímica empleada en el presente trabajo.

Sin embargo, hay que considerar que una de las ventajas de la técnica histoquímica con respecto a la bioquímica, es la localización in situ de la actividad enzimática en regiones específicas del órgano estudiado; y no sólo en una fracción del homogenado.

Goldman y Kohn en 1970, estudiaron células de ovarios de ratas fetales (21 días de gestación) y neonatales (2 dpp) en medio esencial suplementado con suero de bovino fetal al 15 % y

glutamina. Encontraron que la actividad histoquímica fue positiva en algunas células después de 8 a 12 días de cultivo; precisamente cuando el cultivo correspondía a la edad de ratas de 9 a 10 días posparto, etapa en la cual la reacción histoquímica es evidente in situ (Rennels, 1951; Chieffi, et al, 1964; Presl, et al, 1965). Lo anterior les llevó a sugerir que el desarrollo y la diferenciación de la glándula intersticial es independiente de factores extragonadales. Nuestros resultados en cambio, demuestran que en los ovarios intactos, mantenidos en cultivo organotípico en medio esencial o suplementado con suero de bovino fetal, no existe actividad histoquímica detectable.

Es interesante hacer notar que la única diferencia existente entre nuestros medios de cultivo y aquellos utilizados por Goldman y Kohn (1970), es la concentración de suero de bovino fetal (en nuestros experimentos empleamos 10 %, mientras que ellos utilizan el 15 %) y la ausencia de glutamina. Consideramos que la diferencia en la concentración de suero y la presencia de glutamina, en el medio empleado por estos autores no son factores determinantes para inducir el desarrollo y no explican la diferenciación de células de la glándula intersticial. Sin embargo, es probable que el suero empleado en dicha investigación haya contenido una alta concentración de gonadotropinas.

Por otra parte, es necesario enfatizar que en la investigación de Goldman y Kohn (1970), se empleó la técnica de cultivo de tejidos. En estas condiciones, las células se encuentran disgregadas, de tal manera que están expuestas

directamente a todos los componentes del medio de cultivo, y además carecen de las interacciones que normalmente podrían regular su diferenciación in situ. A diferencia de lo anterior, en el método empleado en el presente estudio (cultivo de órganos) se conservan las interacciones celulares. Por lo tanto, es lógico esperar que las células previamente determinadas como esteroideogénicas, respondan de manera diferente según la técnica de cultivo empleada. En este caso existe la posibilidad de que la interacción celular que se tiene en el ovario, inhiba la diferenciación de la glándula intersticial en un medio con baja concentración de gonadotropinas como las presentes en el suero de bovino fetal.

C O N C L U S I O N E S

1. De acuerdo con el primer objetivo, se comprobó que el tejido esteroideogénico del ovario de la rata, puesto en evidencia por la reacción positiva a la $\Delta 5-3\beta$ hidroxisteroide deshidrogenasa (HSDH) aparece desde el 4º día posparto.
2. Los ovarios cultivados en medio esencial suplementado con suero de bovino fetal no permitieron el desarrollo ni la diferenciación de la glándula intersticial.
3. La diferenciación histoquímica de la glándula intersticial del ovario infantil de la rata en cultivo de órganos, depende de la gonadotropina coriónica humana.
4. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la activación y modulación del tejido esteroideogénico del ovario infantil de la rata in situ, dependen de factores extragonadales.

B I B L I O G R A F I A

BAILLIE AH, FERGUSON MM y McHART I 1966 Developments in steroid histochemistry. Academic Press, New York and London.

BELT WD y PEASE DC 1956 Mitochondrial structure in sites of steroid secretion. J Biophysic Biochem Cytol 2 (Suppl.): 369-374.

BOUIN P 1902 Les deux glandes a secretion interne de l'ovaire: la glande interstitielle et le corps jeune. Rev Méd de l'Est Nancy.

BRAWN RH y TSAFRIRI A 1980 Follicles explanted from pentobarbitone-treated rats provide a model for atresia. J Reprod Fert 59: 259-265.

BURDEN HW y LAWRENCE IE 1977 The effects of denervation on the localization of $\Delta 5$ 3β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the rat ovary during pregnancy. Acta Anat 97: 286-290.

BYSKOV AG y HOYER PE 1988 Embriology of mammalian gonads and ducts. En: The Physiology of Reproduction (Knobil E y Neill J eds.) Vol 1 Raven Press, pp 265-302.

BYSKOV AG y SAXEN L 1976 Induction of meiosis in fetal mouse testis in vitro. Dev Biol 52: 193-200.

CHANNING CP y TSAFRIRI A 1977 Mechanism of action of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone on the ovary in vitro. Metabolism 26: 413-468.

CHANDRASHEKAR V y LEATHEM JH 1977 Effect of excess dietary methionine on rat pregnancy: influence on ovarian $\Delta 5$ 3β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. Fert Steril 28 (5): 590-593.

CHIEFFI G, MATERAZZI G y BOTTE V 1964 Comportamento istochimico della 5 3β idrossisteroide deidrogenasi e delle 17β idrossisteroide deidrogenasi (DPN e TPN-dipendenti) nel corticosurrene, nel testicolo e nell ovario di embrioni e neonati di ratto. Atti Soc Pel Sc Nat 10: 515-520.

CHOWDHURY M y STEINBERGER E 1976 Pituitary and plasma levels of gonadotrophins in fetal and new-born male and female rats. J Endocrinol 69: 381-384.

COLLENOT G y COLLENOT A 1977 L'activité 3β -hydroxysteroid dehydrogenase dans les gonades en différenciation de Pleurodeles waltlii (Amphibien, Urodele); visualisation sur coupes sériees a l'une nouvelle technique histochemique. J Embryol Exp Morph 42: 29-42.

CRUMEYROLLE-ARIAS M y ASCHHEIM P 1976 Sécrétion d'oestrogène ovarien induite par HCG chez la ratte impubère hypophysectomisée. C R Acad Sc Paris 282(24): D-2207-2210.

DAHL E 1971 Studies of the fine structure of ovarian interstitial tissue. 1.A comparative study of the fine structure of the ovarian interstitial tissue in the rat and the domestic fowl. J Anat 108(2): 275-290.

DAVENPORT GR y MALLETTE LE 1966 Some biochemical properties of rabbit ovarian Hydroxysteroid Dehydrogenases. Endocrinology 78: 672-678.

DAVIES J, DAVENPORT GR, NORRIS JL Y RENNIE PIC 1966 Histochemical studies of Hydroxysteroid Dehydrogenase activity in mammalian tissues. Endocrinology 78: 667-671.

DAVIES J y BROADUS CD 1968 Studies on the fine structure of ovarian secreting cells in the rabbit. 1. The normal interstitial cells. Am J Anat 123: 441-474.

DAWSON AB y McCABE M 1951 The interstitial tissue of the ovary in infantile and juvenile rat. J Morphol 88:543-571.

DE GROODT M, LAGASSE A y SEBRUYNS M 1957 L'espace perivasculaire dans le tissu interstitiel de l'ovaire vu au microscope électronique. Bull Microsc Apl 7(5): 101-103.

DOHLER KD y WUTKE W 1974 Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. Endocrinology 94(4): 1003-1008.

DUKE KL 1978 Nonfollicular ovarian components. En: The Vertebrate Ovary, Comparative Biology and Evolution. (Jones, R.E. edited). Plenum Press New York, London, pp: 563-582.

ECKSTEIN B y RAVID R 1980 Regulation of ovarian 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase activity by gonadotropin. Bioch Biophys Acta 627: 165-171.

FERGUSON MM 1965 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase activity in the mouse ovary. J Endocrinol 32: 365-371.

FUNKENSTEIN B, NIMROD A y LINDNER HR 1980 The development of steroidogenic capability and responsiveness to gonadotropins in cultured neonatal rat ovaries. Endocrinology 106(1): 98-106.

FUNKENSTEIN B y NIMROD A 1981 Control of developmental processes in cultured neonatal ovaries. En: Development and function of reproductive organs. (A.G. Byskov, & H. Peters, eds). Excerpta Medica, pp. 307-318

GOLDMAN AS, BAKER MK y STANEK AE 1972 Development of Δ^5 3β -Hydroxysteroid and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the testes, adrenals and ovaries of the rabbit fetus. Proc Soc Exp Biol Med 140: 1486-1492.

GOLDMAN AS y KOHN G 1970 Rat ovarian 3β -Hydroxysteroid dehydrogenase: Normal developmental appearance in tissue culture. Proc Soc Exp Biol Med 133: 475-478.

GORE-LANGTON RE y AMSTRONG DT 1988 Follicular steroidogenesis and its control. En: The physiology of reproduction (Knobil E y Neill J eds.) Vol 1 Raven Press, pp. 331-385.

GURAYA SS y GREENWALD GS 1964 Histochemical studies on the interstitial gland in the rabbit ovary. Am J Anat 114: 495-520.

GURAYA SS 1973 Interstitial gland tissue of mammalian ovary. Acta Endocrinol (Kbh) 171: 5-27.

GURAYA SS 1975 Histochemical observations on the lipid changes in the ovarian interstitial gland tissue of rats. J Reprod Fertil 45(1): 141-145.

HAFFEN K 1970 Biosynthesis of steroid hormones by the embryonic gonads of vertebrates. En: Advances in Morphogenesis. (Abercrombie and Brachet, eds.) Academic Press, pp 285-303.

HART DM, BAILLIE AH, CALMAN CK y FERGUSON MM 1966 Hydroxysteroid dehydrogenase development in mouse adrenals and gonads. J Anat 100 (4): 801-812.

HOYER PE y BYSKOV AG 1981 A quantitative cytochemical study of Δ^5 , 3β -Hydroxysteroid dehydrogenase activity in the rete system of the immature mouse ovary. En: Development and function of reproductive organs. (A.G. Byskov, & H. Peters, eds.) Excerpta Medica pp. 216-224.

IRELAND J y RICHARDS J 1978 A previously undescribed role for luteinizing hormone (LH:hCG) on follicular cell differentiation. Endocrinology 102(5): 1458-1465.

KARNOVSKY MJ 1965 A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J Cell Biol 27: 137A.

KENT J y RYLE M 1975 Histochemical studies on three gonadotropin-responsive enzymes in the infant mouse ovary. J Reprod Fertil 42(3): 519-536.

LEESON CR 1963 Observations on the fine structure of rat interstitial tissue. Acta Anat (Basel) 52: 34-48.

LEVY H, DEANE HW y RUBIN BL 1959 Visualization of steroid-3 β -ol-dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. Endocrinology 65: 932-943.

LOMBARD MN y SCHEIB DS 1972 Aparition et évolution des cellules stéroïdogènes de l'ovaire de souris: étude cytoenzymologique. Arch Anat Microsc Morphol Exp 61(4): 439-452.

LUFT JH 1961 Improvements in epoxy resins embedding methods. J Biophys Biochem Cytol 9: 409-416.

LUNN SF y LORAINE JA 1973 The effect of initial age on the response of the rat to treatment with gonadotrophins. Acta Endocrinol 72: 209-217.

MANDEL J 1935 An experimental study of ovarian irradiation organogenesis in the rat: An electron microscopy study. Arch Anat Microsc Morphol Exp. 69: 297-318.

MERCHANT LH 1975 Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells: An ultrastructural study. Dev Biol 44: 1-21.

MERCHANT LH 1976 The role of germ cells in the morphogenesis and cytodifferentiation of the rat ovary. En: Progress in Differentiation Research (Muller-Béat, ed.) pp 453-462 North-Holland, Amsterdam.

MERCHANT LH 1979 Follicular atresia and the formation of an interstitial gland. Eur J Gyn Reprod Biol. 9(3): 219.

MERCHANT LH y CENTENO UB 1981 Morphogenesis of the ovary from the steril W/Wv mouse. En: Advances in the morphology of cells and tissues. (Ed Acosta VE) Alan R. Liss New York. pp 383-392.

MOOR RM 1973 Oestrogen production by individual follicles explanted from ovaries of sheep. J Reprod Fert 32: 545-548.

MORI H y MATSUMOTO K 1970 On the histogenesis of the ovarian interstitial gland in rabbits. The primary interstitial gland. Am J Anat 129: 289-306.

MOSSMAN HW, KOERING MJ y FERRY D 1964 Cyclic changes of interstitial gland tissue of the human ovary. Am J Anat 115: 235-255.

MOSSMAN HW y DUKE KL 1973 Features and problems associated with the mammalian ovary. En: Comparative morphology of the mammalian ovary. University of Wisconsin Press, Madison.

MOTTA P, TAKEVA Z y BOURNEVA V 1970 A Histochemical study of A5 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase activity in the interstitial cells of the mammalian ovary. Experimentia 26(2): 1128-1129.

PAVIC D 1963 The effect of gonadotrophic hormones in young rat ovaries grown in organ culture. J Endocrinol 26: 531-538.

PELLOUX MC, PICON R, GANGNERAU MN y DARMOUL D 1988 Effects of busulfan on ovarian folliculogenesis, steroidogenesis and anti-muellerian activity of rat neonates. Acta Endocrinol 118(2): 218-226.

PELUSO JJ 1989 Role of the peripubertal pattern of FSH, LH, and prolactin secretion in regulating in-vitro steroidogenesis and follicular growth within juvenile rat ovaries. J Reprod Fert 86(2): 705-711.

PICON R 1985 Stades initiaux de la steroidogenese dans les gonades de mammiferes. Arch Anat Micros Morph Exp 74(1): 81-86.

PICON R, DARMOUL D, ROUILLER V y DURANTEAU L 1988 Activity of 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase/isomerase in the fetal rat ovary. J Steroid Biochem 31(5): 839-843.

PFLUGER R. 1863 Observation on ovarian tissue of rats. Rev Méd de l'Est Nancy.

PRESL J, JIRASEK J, HORSKY J y HENZL M 1965 Observations on steroid-3 β -ol dehydrogenase activity in the ovary during early postnatal development in the rat. J Endocrinol 31: 293-294.

PRESL J, HERZMANN J y HORSKY J 1969 Oestrogen concentrations in blood of developing rats. J Endocrinol 45: 611-612.

PUDNEY JA 1987 Overall view of the organization of the vertebrate gonad and the structure of steroidogenic cells. En: Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology (J. Chester-Jones, P.M. Ingleton and J.G. Phillips, eds.), Plenum Press, pp. 57-94.

QUATTROPANI SL 1973 Morphogenesis of the ovarian interstitial tissue in the neonatal mouse. Anat Rec 177: 569-584.

QUATTROPANI SL y WEISZ J 1973 Conversion of progesterona to estrone and estradiol in vitro by the ovary of the infantile rat in relation to the development of its interstitial tissue. Endocrinology 93 (6): 1269-1276.

RENNELS E 1951 Influence of hormones on the histochemistry of ovarian interstitial tissue in the immature rat. Am J Anat 88: 63-100.

ROBINSON A, BUTCHER R y SUTHERLAND E 1971 Cyclic AMP Academic Press. New York, Sn Francisco, Londres.

RUBIN LB, DEANE HW y HAMILTON JA 1963 Biochemical and histochemical identification on Δ^5 3β - hydroxysteroid dehydrogenase activity in the adrenal glands and ovaries of diverse mammals. Endocrinology 73: 748-763.

SCHLEGEL RJ, FARIAS E, RUSSO NC, MOORE JR y GARDNER LI 1967 Structural changes in the fetal gonads and gonaducts during maturation of an enzyme, steroid 3β α -dehydrogenase, in the gonads, adrenal cortex and placenta of fetal rats. Endocrinology 81: 565-572.

SMEATON TC, ARCONDOULIS DE y STEELE PA 1975 The synthesis of testosterone and estradiol- 17β by the gonads of neonatal rats in vitro. Steroids 26 (2): 181-192.

STEIN LE y ANDERSON A 1981 In vitro analysis of ovarian differentiation and the initiation of meiosis in the rat. Acta Anat 110: 189-205.

SUZUKI K, KAWAKURA K y TAMAOKI B 1978 Effect of pregnant mare's serum gonadotrophin on the activities of 4-5 α -reductase, aromatase and other enzymes in the ovaries of immature rats. Endocrinology 102 (5): 1595-1605.

TAYLOR FB 1961 Histochemical changes in the ovaries of normal and experimentally treated rats. Acta Endocrinol 36: 361-374.

TUCKEY RC, LEE G, COSTA ND y STEVENSON PM 1984 The composition and distribution of lipid granules in the rat ovary. Mol Cell Endocrinol 38(2-3): 187-195.

TURNER CD y BAGNARA JT 1971 Endocrinology of the ovary. En: General Endocrinology. W.B. Saunders Co. Philadelphia, London, Toronto. pp 399, 490-543.

WEISZ J y FERIN M 1970 Pituitary gonadotrophins and circulating LH in immature rats. A comparison between normal females and males and females treated with testosterone in neonatal life. En: "Gonadotrophins and ovarian development" (Butt WR, Crooke AC y Ryle M eds) Livingstone, Edimburgh. 339-350.

WEISZ J y GONSALUS P 1973 Estrogen levels in immature female rats: true or spurious - ovarian or adrenal ?. Endocrinology 93: 1057-1065.

YOUNGLAI E y BORGMANN A 1988 Changes in 3β -Hydroxysteroid dehydrogenase activity in the developing rabbit ovary. J Steroid Biochem 31(6): 983-986.

ZAMBONI L y MERCHANT LH 1973 The true morphology of mouse primordial germ cells in extragonadal location. Am J Anat 137: 299.

ZETTERQVIST H 1956 The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Doctoral Thesis, Karolinska Institutet. Estocolmo, Suecia.