



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

METABOLISMO DE HORMONAS ESTEROIDES EN
LAS CELULAS DE LA TECA EXTERNA DE
FOLICULOS PREOVULATORIOS DEL OVARIO
DE GALLINA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

(BIOQUIMICA)

P R E S E N T A

BIOL. EMMA RODRIGUEZ MALDONADO

ASESOR: DR. ENRIQUE PEDERNERA ASTEGIANO

MEXICO, D. F. FALLA DE ORIGEN 1995



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.

A Viridiana y Hugo

Por su amor y comprensión, por ser el principal motivo de mi vida.

A Blanca, Paco, Elías, Esther y Edith

Con gran cariño

A Falla y Socorro

Por su gran apoyo y paciencia

AGRADECIMIENTOS

A los miembros de mi jurado por su cuidadosa revisión y sus valiosas críticas

Dr. Roberto Domínguez Casalá
Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza
Dr. Enrique Pedernera Astegiano
Dr. Vicente Díaz Sánchez
Dr. Guillermo Mendoza Hernández

Al Dr. Pedro Nicolás Velázquez por sus atinados consejos y gran apoyo para la realización de este trabajo.

A la Dra. Carmen Méndez Herrera y a la QFB Patricia V. Torres Durán por su colaboración para el análisis estadístico de los datos.

A J. Francisco Rodríguez y Al Sr. Rafael Enriquez por la elaboración en las ilustraciones.

Al Sr. Jesús Ledesma por su trabajo fotográfico.

A todos mis compañeros y amigos, por su valioso apoyo y por compartir conmigo alegrías y sinsabores

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

Abreviatura (Por sus siglas en inglés)	Nombre
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotina y adenina reducido
NADP ⁺	Fosfato de dinucleótido de nicotina y adenina oxidado
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotina y adenina oxidado
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina oxidado
FMN	Mononucleótido de flavina
LH	Hormona luteinizante
FSH	Hormona estimulante del folículo
hCG	Gonadotropina coriónica humana

RESUMEN

En el ovario maduro de las aves, los folículos preovulatorios sintetizan hormonas esteroideas con la participación de tres poblaciones celulares, de tal modo que las células de la granulosa sintetizan progesterona, la capa de la teca interna produce andrógenos y la capa de la teca externa los aromatiza a estrógenos. El objetivo de este estudio fue aportar más evidencias sobre las capacidades esteroideas de las células de la teca externa de los folículos preovulatorios, analizando la biotransformación de precursores marcados. Se separaron y disociaron las células de la teca externa de folículos preovulatorios de gallinas en postura, utilizando métodos enzimáticos y mecánicos, tomando muestras de folículos de diferente diámetro, F1 (3.5 cm), F3 (2.5 cm) y F5 (1.5 cm). Se utilizaron como precursores pregnenolona (P5), progesterona (P4), dehidroepiandrosterona (DHEA), androstendiona y testosterona (T). Se incubaron 5×10^5 células ováricas durante 15 minutos y los metabolitos producidos fueron separados e identificados por cromatografía en capa fina. Las células de la teca externa metabolizaron principalmente P5 a 5-Pregnen- $3\beta,20\beta$ -diol (pregnendiol), (F1:24%, F3:39%, F5:47%) y se obtuvo muy poca cantidad de P4 (F1: 1.3%, F3:2.3%, F5:2.4%). Con P4 como precursor únicamente se detectó 20β -dihidroprogesterona (20β -DHP) (F1:49%, F3:34%, F5:52%). A partir de DHEA se encontró como metabolito androstendiona (F1:11%, F3:23%, F5:29%) y pocas cantidades de estrona (E1) (F1:0.4%, F3:0.9%, F5:1.5%). Cuando el precursor fue androstendiona se detectó principalmente E1 (F1:0.2%, F3:5%, F5:7%) y pequeñas cantidades de T (F1:0.4%, F3:0.7%, F5:1%) y 17β -estradiol (E2) (F1: 0.7%, F3:1.5%, F5:1.7%). La T fue transformada activamente a androstendiona (F1:30%, F3:50%, F5:50%) y muy poco a E2 (F1:1.4%, F3:1.7% F5:1.9%) y E1 (F1:0.5%, F3:1%, F5:2%). Se concluye que en la teca externa de los folículos preovulatorios de ave se presentan las actividades enzimáticas de 20β -reductasa (a partir de progestinas), de 3β -HSD (a partir de DHEA), de 17β -HSD (a partir de testosterona) y de $P450_{aro}$ (a partir de androstendiona y testosterona); que la actividad de estas enzimas disminuye en relación a la maduración folicular, excepto para la 20β -reductasa que se mantiene; y que la teca externa funciona como un compartimento esteroideogénico particular que es capaz de interactuar con la células de la teca interna y de la granulosa en la esteroideogénesis folicular.

INDICE

	Página
INTRODUCCION	
EL OVARIO	1
-ESTRUCTURA OVARICA	1
-CELULAS GERMINALÉS	2
-ESTRUCTURA FOLICULAR	4
Clasificación folicular	4
Foliculogénesis	7
Células foliculares	8
a) Células de la granulosa	
b) Células de la teca	
LAS HORMONAS ESTEROIDES	11
ESTEROIDOGENESIS	12
-Propiedades bioquímicas de los citocromos P450	12
-Propiedades bioquímicas de las oxidoreductasas	13
-El colesterol	14
-Síntesis de progesterona	14
-Síntesis de andrógenos	20
-Síntesis de estrógenos	20
REGULACION DE LA ESTEROIDOGENESIS FOLICULAR	
-El papel de las gonadotropinas	21
MADURACION FOLICULAR	22
ENZIMAS ESTEROIDOGENICAS DURANTE LA MADURACION FOLICULAR	25
-P450 _{sc}	
-3 β -HSD	
-P450 _{c17}	
-P450 _{17α}	
TEORIA BICELULAR	28
JUSTIFICACION	30
OBJETIVOS E HIPOTESIS	31
MATERIALES Y METODOS	32
RESULTADOS	38
DISCUSION Y CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFIA	61

INTRODUCCION

Las dos funciones principales del ovario son producir gametos femeninos y hormonas esteroides sexuales. Las hormonas sexuales juegan un papel fundamental en la diferenciación gonadal, el establecimiento de los caracteres sexuales secundarios y la conducta sexual.

En los mamíferos existe un ciclo ovárico bien reconocido durante el cual ocurre el desarrollo folicular, en tanto que en las aves la actividad reproductiva del ovario es continua durante la época de crianza debido a la postura de huevos. En la gallina doméstica la postura de huevos puede prolongarse indefinidamente si las condiciones ambientales y alimenticias son adecuadas.

EL OVARIO

En la mayoría de las aves, los ovarios derecho e izquierdo se forman en estados embrionarios. Sin embargo, sólo un ovario persiste en la vida adulta pues el otro involuciona. El ovario funcional está situado en el lado izquierdo del cuerpo, en el extremo cefálico de los riñones y se ancla a la pared del cuerpo por el ligamento mesovárico (Sturkie, 1976).

ESTRUCTURA OVARICA

El ovario de las aves es morfológicamente muy semejante al de los mamíferos. Sin embargo, las diferencias que se presentan tanto en la estructura como en la función ováricas entre ambas clases, son importantes cuando se consideran las propiedades esteroideogénicas y su control.

El ovario de las aves consiste esencialmente de una corteza donde se encuentran los ovocitos, la cual rodea a una médula interna muy vascularizada, compuesta principalmente por tejido conectivo. En los ovarios inmaduros estas dos áreas se distinguen claramente, pero a medida que el ovario crece y madura, la división es cada vez menos evidente y

posteriormente se pierde (King, 1974, citado por: Hodges, 1974). De tal manera que durante el periodo de actividad sexual, el ovario tiene una apariencia de un racimo de uvas, debido a que los folículos en desarrollo se proyectan desde la superficie ventral del ovario y cada uno de ellos es sostenido por un tallo.

La superficie de la corteza está cubierta por el epitelio germinal, generalmente cuboide, que consta de una sola capa de células que poseen núcleo vesicular redondeado. Debajo del epitelio germinal está la túnica albugínea, una capa de tejido conectivo (Hodges, 1974).

El ovario maduro de las aves está formado por folículos en diferentes estados de desarrollo, los cuales están rodeados por estroma. El estroma es adyacente a la túnica albugínea y está formado por tejido conectivo que contiene numerosos vasos sanguíneos, gran cantidad de fibras de colágena y varios tipos celulares como fibroblastos, eosinófilos, células vacuolares y células intersticiales. La presencia de las células vacuolares concuerda con la existencia de folículos postovulatorios (folículos que han liberado el ovocito maduro y que adquieren una estructura en forma de copa) en varios estados de regresión (Hodges, 1974). Los folículos que iniciaron su desarrollo y, que por algún mecanismo desconocido, éste fue interrumpido, son los folículos atrésicos. Dichos folículos muestran diferentes estados de regresión y las células de algunos de ellos constituyen el tejido glandular intersticial del ovario. La función de la glándula intersticial es almacenar colesterol y producir hormonas esteroides, las cuales influyen en el crecimiento y la maduración de los folículos (Guraya y Chalana, 1976).

CELULAS GERMINALES

En la parte central de un folículo en desarrollo se encuentra el ovocito (célula germinal en división meiótica), el cual se origina de una célula germinal primordial. Las células germinales primordiales se observan en etapas tempranas del desarrollo embrionario entre las células endodérmicas del saco vitelino. Más tarde, todavía en la etapa embrionaria, las células primordiales llegan a la gónada en formación y se convierten en

ovogonias. Según un estudio morfológico realizado por Hughes (1963), en las aves, las ovogonias se agrupan formando "nidos" en el corteza ovárica y se multiplican por mitosis. Los primeros ovocitos se observan en la etapa fetal, entre el día 13 y 14 de incubación, los cuales se encuentran en la profase I de la meiosis. Al mismo tiempo que se va observando un número mayor de ovocitos y la actividad mitótica de las ovogonias, que aún persisten, disminuye. Cada ovocito contiene un núcleo central que presenta uno o dos nucleólos y cromatina difusa, su citoplasma es granulado y muestra abundante retículo endoplásmico liso y rugoso, aparato de Golgi y mitocondrias. Entre el día 19 de incubación y hasta el nacimiento, se empiezan a observar ovocitos en fase de diploteno y el número de ovocitos en dicha fase va aumentando gradualmente. De tal modo, que a los 17 días después del nacimiento, la mayoría de las células germinales son ovocitos primarios en estado de diploteno (a diferencia de los ovocitos de mamíferos, en aves no se observa un estado de dictiótenu). A los 14 días de edad se observa que los ovocitos primarios están rodeados individualmente por células somáticas, formando los folículos corticales.

En el ovario de aves sexualmente maduras, los ovocitos contenidos en los folículos corticales y en los folículos en cualquier estado de desarrollo son ovocitos primarios. Sólo los ovocitos contenidos en los folículos maduros liberan un cuerpo polar y se transforman en ovocitos secundarios, poco antes de la ovulación. En la corteza ovárica existe un vasto número de folículos corticales disponibles y aunque muchos de ellos inician el desarrollo, la mayoría no alcanza la madurez. Las estructuras más obvias en la superficie del ovario maduro son los folículos preovulatorios que contienen ovocitos con gran cantidad de vitelo. Los folículos, en cualquier estado de desarrollo, están unidos a la masa principal del ovario mediante pedículos (Hodges, 1974; Sturkie, 1976).

En las aves, un folículo cortical que inicia su desarrollo crece rápidamente y en un lapso de 9-10 días alcanza la madurez (Sturkie, 1976). Durante dicho desarrollo, en el citoplasma del ovocito se van almacenando nutrientes (fosfoproteínas especiales y lipoproteínas ricas en triacilglicéridos) durante un proceso llamado vitelogénesis, el cual es indispensable para asegurar los requerimientos alimenticios durante el desarrollo y creci-

miento del futuro embrión. En las gallinas, la yema o vitelo está compuesta por 48.7% de agua, 32.6% de lípidos, 16.6% de proteínas, 1% de carbohidratos y 1.1% de minerales (Welty, 1975). La cantidad de vitelo es el principal factor que determina el gran tamaño del ovocito maduro de las aves.

ESTRUCTURA FOLICULAR

Los folículos son las unidades funcionales del ovario maduro. Su fisiología está relacionada estrechamente con el ovocito, de modo que a éste le aportan sustancias para formar el vitelo y le dan sostén durante el proceso de maduración. Algunas células foliculares son capaces de secretar factores que tienen efectos sobre el desarrollo del ovocito. Además, los folículos están involucrados en la síntesis de hormonas sexuales. Durante la edad adulta, la fuente más importante de hormonas ováricas son algunas capas de células de los folículos en distintos estados de desarrollo (Wells y Gilbert, 1984).

Clasificación folicular

A medida que el folículo cortical inicia su desarrollo, las células somáticas que rodean al ovocito se diferencian formando las distintas capas que constituyen a los folículos en los diferentes estados de maduración. Al proceso de diferenciación y crecimiento folicular se le llama foliculogénesis. El folículo mayor, que es el próximo a ovular, representa la fase final de la foliculogénesis y las capas celulares que lo forman (desde la membrana citoplasmática del ovocito hacia afuera) son las siguientes: capa perivitelina, las células de la granulosa, la lámina basal, las células de la teca (interna y externa), la túnica superficial, la túnica albugínea y el epitelio superficial (figura 1). Estas capas celulares tienen un papel muy importante durante el crecimiento y maduración del ovocito.

El folículo maduro de las aves varía en tamaño dependiendo de las especies y del tamaño del huevo puesto. En gallinas sexualmente maduras, los folículos próximos a ovular tienen un tamaño promedio de 40 mm.

La estructura del folículo maduro de las aves es semejante a la de los mamíferos,

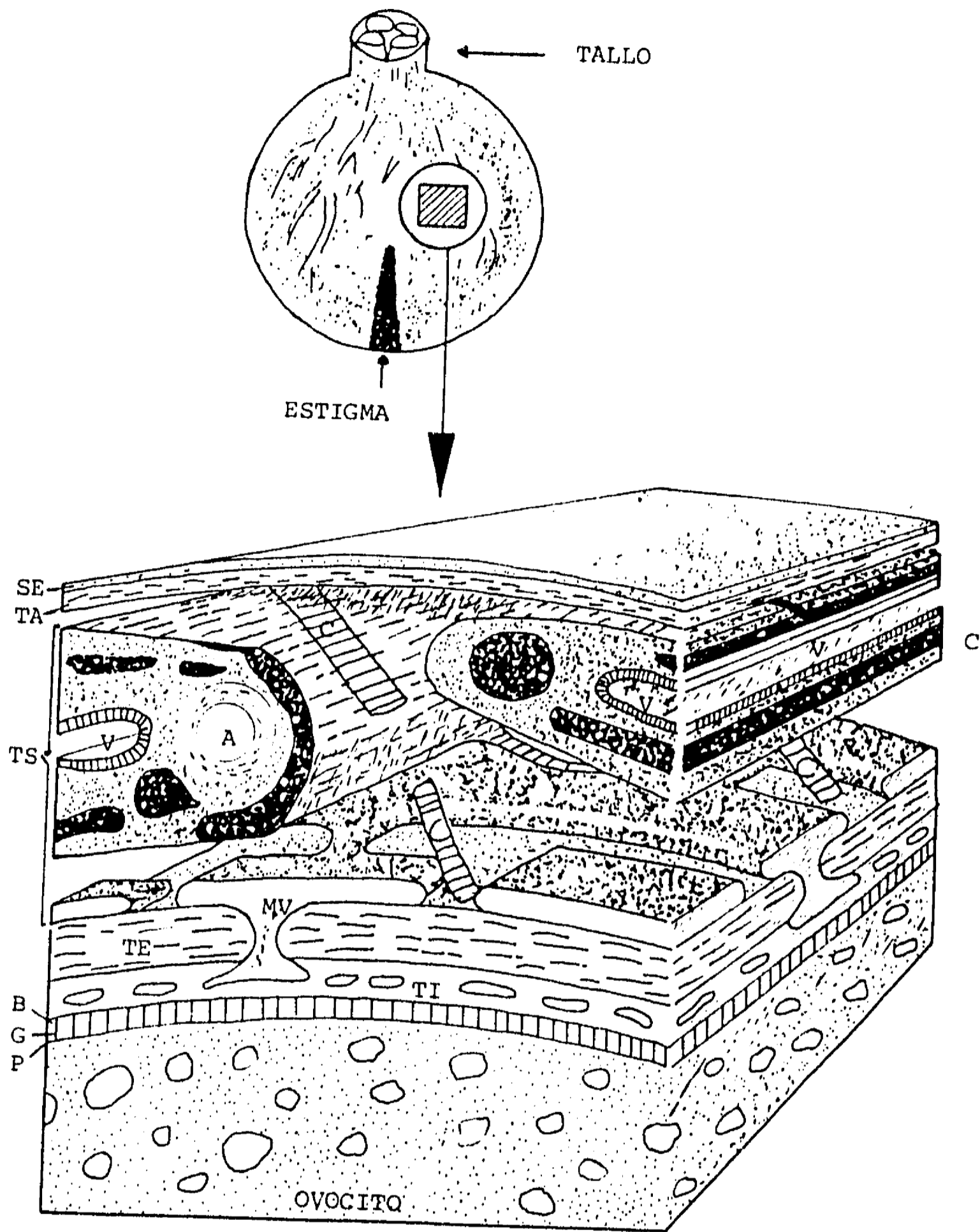


Figura 1. Dibujo Esquemático de F1. El diagrama inferior es una representatción amplificada de una parte de la pared folicular. P: capa perivitelina; G: capa granulosa; B: membrana basa; TI: teca interna; TE: teca externa; TS: túnica superficial; MV: capa venosa media; A: arteria; V: vena; C: cordón; TA: túnica albugínea; SE: epitelio superficial. Tomado de Van Nassauw, (1994).

5
FALLA DE ORIGEN

aunque existen diferencias entre las dos clases. Los folículos preovulatorios de las aves son más grandes que los de los mamíferos y contienen una sola capa de células de la granulosa. Su superficie es una capa gruesa de tejido conectivo altamente vascularizada. En cambio, en los mamíferos los folículos preovulatorios son pequeños y su superficie está rodeada por el estroma ovárico. Un aspecto sobresaliente de los folículos preovulatorios de los mamíferos es que tienen varias capas de células de la granulosa y entre ellas se desarrolla un antro, el cual se llena de líquido folicular, que es producido por las mismas células de la granulosa.

En casi todas las especies de aves dentro del ovario hay varios grupos de folículos claramente reconocibles, uno siguiendo a otro en orden creciente de tamaño. El grupo más numeroso está formado por folículos corticales que están embebidos en el estroma ovárico y su diámetro es menor de 1 mm (Nitta y cols. 1993). El siguiente grupo está formado por los folículos blancos pequeños, de 1-3 mm de diámetro. Otro grupo, en tamaño creciente, está constituido por 6-25 folículos de 3-6 mm de diámetro, que son los folículos blancos grandes y cuyo vitelo es de color blanco-amarillo. El grupo siguiente lo constituyen 10-15 folículos amarillos pequeños de 6-10 mm de diámetro, que presentan el vitelo más amarillento y es en este grupo donde ocurre la selección de un solo folículo por día para alcanzar la diferenciación final (Johnson, 1993). El grupo más visible consiste de 5-6 folículos de 10-40 mm de diámetro, con vitelo claramente amarillo, son los folículos preovulatorios. Su nomenclatura ha sido utilizada desde hace ya varios años (Huang y Nalbandov, 1979; Llewelyn, 1981; Etches y Petite, 1990), la cual es concordante con la secuencia de ovulación diaria. Los folículos se denominan según su tamaño y en forma decreciente como F1, F2,... F6; siendo F1, el más grande y próximo a ovular.

Los folículos preovulatorios se distinguen por su capa superficial muy vascularizada, excepto en la región del estigma, la cual es una banda claramente visible debido a su apariencia avascular y está localizada en la pared del folículo opuesta al pedículo. Según la observación de Romanoff y Romanoff (1949, citado por: Van Nassauw y cols., 1994), la región del estigma está adyacente a las células de la teca y es una capa compacta, atravesada

por pequeñas arterias y venas, formada principalmente por células musculares de tipo liso. Durante la maduración del folículo la vascularización del estigma es ligeramente visible, pero distinguible del resto de la pared folicular. Este es el sitio donde se rompe el folículo durante la ovulación y permite la liberación del ovocito.

Foliculogénesis

En la polla, la foliculogénesis empieza después del nacimiento, cuando casi todos los ovocitos están en el estado de diploteno de la profase meiótica (estado latente).

Durante el desarrollo embrionario las células somáticas que rodean a los ovocitos se originan del epitelio celómico y del mesénquima de la cresta gonadal. La diferenciación de las células somáticas se inicia cuando aparecen los primeros los ovocitos primarios.

En casi todas las especies, los ovocitos en estado latente están rodeados únicamente por células pregranulosas, que son las primeras células somáticas que inician su diferenciación u están separadas entre sí por una lámina basal. El ovocito, la lámina basal y las células pregranulosas forman el folículo primordial.

A medida que el ovario se aproxima a la madurez, los folículos en crecimiento se acercan a la superficie ovárica. En el ovario maduro el crecimiento folicular es el resultado de la proliferación de células foliculares preexistentes. No se conoce cual es el mecanismo que dispara el inicio del crecimiento folicular, sin embargo, se ha visto que las gonadotropinas pueden jugar un papel importante, ya que estimulan el crecimiento folicular tanto *in vivo* como *in vitro* (Knobil and Neil, 1988).

En los primeros estados del crecimiento folicular, la membrana plasmática del ovocito establece contacto directo con las membranas de las primeras células foliculares (pregranulosas). A medida que el crecimiento folicular avanza se acumula una sustancia entre la membrana del ovocito y las membranas de las pregranulosas, las que en conjunto forman la zona pelúcida. A su vez, las células pregranulosas se diferencian y forman la capa

de las células de la granulosa, las cuales se unen estrechamente entre sí mediante desmosomas. Las células de la granulosa gradualmente desarrollan procesos citoplasmáticos en dirección al ovocito. En folículos maduros, la zona pelúcida está formada por la zona radiada, por los procesos de las células de la granulosa y por el material acumulado, que es producido por las células de la granulosa (Sturkie, 1976 y Perry y cols., 1978).

Células foliculares

A continuación se describen las características morfológicas de las células foliculares que participan en la secreción de hormonas esteroideas: las células de la granulosa y de la teca.

Los cambios morfológicos que presentan las células foliculares durante la maduración de los folículos están estrechamente relacionados con su función.

a) Células de la granulosa.

Las células de la granulosa constituyen una capa de células epiteliales inmediatamente adyacente al ovocito. En los folículos corticales, estas células son alargadas y presentan poco desarrollo de sus organelos. Durante el desarrollo del folículo las células de la granulosa se incrementan en número y forman una sola capa de células cúbicas. En folículos de tamaño intermedio, esta capa se observa en forma estratificada (epitelio pseudoestratificado), lo que le da la apariencia de una multicapa y como consecuencia de ello, dicha capa alcanza su máximo grosor en estados intermedios. En los folículos grandes, el grosor de la capa disminuye hasta constituir nuevamente un epitelio de una sola capa de células cúbicas y alargadas, como en los folículos corticales (Dahl, 1970; Hodges, 1974; Perry y cols., 1978).

En las células de la granulosa de folículos previtelogénicos y vitelogénicos tempranos, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, las mitocondrias y los cuerpos lipídicos de tamaño variable están más desarrollados (Guraya, 1976). Las vacuolas lipídicas, que consisten principalmente de fosfolípidos y algunos triglicéridos, son muy semejantes a los

que se observan en el vitelo (Guraya, 1959).

b) Células de la Teca

Las funciones de las células de la teca son la síntesis de hormonas esteroideas, participar en la formación de un aparato suspensor para el ovocito en desarrollo y mantener una presión intrafolicular constante durante el proceso de ovulación. Esta última función se le atribuye a la teca externa debido a que presenta células de tipo muscular (Johnson, 1994).

En los folículos blancos pequeños (1-3 mm), las células mesenquimatosas cercanas a la capa de las células de la granulosa se diferencian y forman un estrato constituido por varias capas de células de la teca. Dicho estrato está separado de la capa de la granulosa por una membrana basal bien definida.

El estrato tecal está constituido por varios tipos de células, fibras de colágena, vasos sanguíneos y capilares. La vascularización y la red de colágena aumentan progresivamente conforme crece el folículo. En los folículos blancos pequeños se observa que el estrato tecal empieza a diferenciarse en dos regiones o capas, una es la teca interna (adyacente a la membrana basal) y la otra es la teca externa (continua a la teca interna).

b.1) Teca Interna

La teca interna se caracteriza por su gran vascularización y su alto contenido de células con abundantes inclusiones lipídicas, también llamadas células esteroideogénicas típicas (Dahl, 1970, Velázquez y cols., 1991). También se observan fibroblastos y pequeñas ramas de nervios. Durante el desarrollo folicular, las células esteroideogénicas típicas desarrollan organelos característicos de células secretoras esteroideas como retículo endoplásmico liso y mitocondrias con crestas tubulares (Velázquez y cols, 1991). Además se observa aumento en la cantidad de gotas lipídicas en el citoplasma y reacción positiva a las pruebas de colesterol, ésteres de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos.

Otro cambio morfológico que se observa durante la maduración folicular es una aparente disminución del área ocupada por las células esteroideogénicas típicas. Sin embargo, cuando se considera el aumento en el diámetro del folículo, el volumen absoluto de dichas células aumenta (Hernández-Vértiz y cols., 1993).

b.2) Teca Externa

La teca externa está constituida por capas concéntricas de células elongadas tipo fibroblasto las cuales están separadas entre sí por fibras de colágena (Velázquez y cols., 1991). En el citoplasma de estas células se observa una zona periférica de microfilamentos alineados en forma paralela a la membrana plasmática (Perry y cols., 1978). Se ha descrito que las células tipo fibroblasto presentan propiedades contráctiles (células miodes) (Unsicker y cols., 1983) y que por inmunocitoquímica, muestran reacción positiva para α -actina (Van Nassauw y cols., 1994).

Las células tipo fibroblasto presentan un núcleo ovoide con poca heterocromatina y uno o más nucleólos visibles. En el abundante citoplasma se han identificado polisomas, pocas vesículas de retículo endoplásmico, mitocondrias con crestas tubulares y ocasionalmente, inclusiones de lípidos. No observan vesículas de retículo endoplásmico liso (Velázquez y cols., 1991).

En la zona periférica de la teca externa se encuentran acúmulos (islotos) de células epiteliales poco diferenciadas que están delimitadas por una lámina basal (Velázquez y cols., 1991). Estos grupos celulares muestran reacción inmunocitoquímica positiva para aromatasa (Nitta y cols., 1991) y son negativas para α -actina (Van Nassauw, comunicación personal).

Los islotos de células epiteliales indiferenciadas son evidentes en folículos preovulatorios pequeños (F5) y prácticamente desaparecen en los mayores (F1). El área ocupada por los islotos disminuye marcadamente conforme madura el folículo, aunque, el volumen total de las células indiferenciadas aumenta, alcanzando un valor máximo en el folículo F3 y posteriormente disminuye en el folículo mayor (Hernández-Vértiz y cols., 1993).

LAS HORMONAS ESTEROIDES

Las hormonas esteroides son moléculas hidrofóbicas que después de ser sintetizadas pasan al torrente sanguíneo. Pueden atravesar las membranas biológicas y no se almacenan en vesículas.

En la gallina, algunos de los efectos de las hormonas sexuales son: deposición de grasa, forma y pigmentación de las plumas, desarrollo del oviducto, ruptura de la placa ocluyente, síntesis de proteínas en el oviducto, movimiento del ovocito a través de éste, síntesis de lipoproteínas en el hígado, regulación de la liberación de hormonas gonadotrópicas, influencia sobre el metabolismo del calcio en el intestino y en el hueso.

Las concentraciones plasmáticas de las hormonas esteroides presentan pocas variaciones, aunque se presentan fluctuaciones temporales de gran magnitud que están relacionadas con la ovulación (Johnson y van Tienhoven, 1980).

La pregnenolona y la progesterona son las progestinas que se producen en mayor cantidad en los folículos preovulatorios. En la gallina doméstica, la progesterona juega un papel clave en la regulación de la ovulación. Pocas horas antes de la ovulación las concentraciones plasmáticas de progesterona y de LH aumentan simultáneamente (Etches y Cunningham, 1976). Además, la inyección de progesterona causa la ovulación prematura en un ciclo normal y su perfusión induce la ovulación en un ovario aislado (Wiebe y cols, 1990).

Los principales andrógenos producidos por el ovario de la gallina son la dehidroepiandrosterona (DHEA), la androstendiona y la testosterona. Aunque son productos ováricos no presentan efectos fisiológicos relevantes sobre el ciclo reproductivo, dado que su concentración es relativamente baja y se metabolizan rápidamente, ya que son los precursores directos de los estrógenos. Además se ha descrito que la concentración plasmática de andrógenos, presenta variaciones durante el ciclo ovulatorio (Shanabi, 1975; Hammond, 1980; Etches, 1981 citados por: Wells y Gilbert, 1984).

En relación a los estrógenos, se ha observado que en el ovario embrionario de aves tienen un papel importante en la diferenciación sexual de la hembra. Por ejemplo, el 17β -estradiol modula la proliferación de la corteza en el ovario del embrión de pollo (Scheib, 1983) y de la diferenciación del conducto izquierdo de Müller (MacLaughlin y cols., 1983). El hecho de que los estrógenos se producen en mayor cantidad en los ovarios embrionarios que en los testículos embrionarios de la misma edad y que la producción de progesterona y andrógenos es similar tanto en el ovario como en el testículo sugiere la participación de los estrógenos en la diferenciación sexual de las aves (Tanabe y cols., 1986). Por otro lado, se ha observado que en el ovario de aves adultas, los estrógenos pueden regular negativamente la producción de gonadotropinas por la hipófisis y también actuar como reguladores de la esteroidogénesis en las células foliculares, así como regular la actividad de las gonodotropinas en el ovario (Hsueh y cols., 1984; Roberts y Skinner, 1990; Jonhson, 1993).

Los principales estrógenos que aparecen en la orina, sangre y ovario de las aves son la estrona y el 17β -estradiol, aunque también se ha informado que cuatro epímeros del estriol, derivados del 14-ceto- 17β -estradiol, están presentes en la orina de la gallina (Common y cols., 1965 citado por Sturkie, 1976).

ESTEROIDOGENESIS

La síntesis de esteroides sexuales involucra la participación de las enzimas citocromo P450 y otras esteroide oxido-reductasas.

Propiedades bioquímicas de los citocromos P450

Los citocromos P450 representan una superfamilia de hemoproteínas monooxigenasas que juegan un papel importante en el metabolismo de una amplia variedad de sustratos endógenos y exógenos. Estas hemoproteínas se encuentran en forma de complejos enzimáticos que contienen, además, otras proteínas que participan en la transferencia de electrones y protones a partir del NADPH.

El estado de oxidación del Fe central del grupo hemo de los citocromos P450, le confiere características espectrales por las que se le clasifica como citocromos tipo *b*. El grupo hemo forma el sitio activo de la enzima y se une al sustrato y al oxígeno molecular (O₂), según su estado de oxidación. El monóxido de carbono (CO) compite con el O₂ por el sitio activo de la enzima y de este modo inhibe la acción enzimática. La interacción entre el CO y el hemo del citocromo en estado reducido, presenta un pico máximo de absorción a 450 nm, de allí se deriva su nombre de P450.

Las reacciones catalizadas por los P450 esteroideogénicos pueden ser monooxigenaciones (una sola hidroxilación) en una posición específica o una serie de monooxigenaciones que dan por resultado la ruptura de un enlace C-C o la aromatización del anillo A del esteroide.

Los citocromos P450 esteroideogénicos están asociados a la membrana mitocondrial interna o a la membrana del retículo endoplásmico liso. En los sistemas mitocondriales se han identificado dos proteínas que transfieren dos electrones y el protón del NADPH al hemo del P450 (Hanukoglu y cols., 1987): una ferredoxina-reductasa, que es una flavoproteína que utiliza como cofactor al FAD y una ferredoxina (también llamada adrenoxina), que es una ferrosulfoproteína del tipo Fe-S. En cambio, los sistemas microsomales contienen sólo una flavoproteína llamada P450-reductasa que utiliza FAD y FMN como cofactores.

Propiedades bioquímicas de las óxido-reductasas

El otro tipo de enzimas que participan en la esteroidogénesis son las óxido-reductasas, también llamadas deshidrogenasas. Estas enzimas catalizan las reacciones de oxidoreducción al adicionar o sustraer un ión hidruro (H⁻) y un ión hidronio (H⁺), actuando sobre los grupos funcionales alcohol (-C-OH), aldehído (O=C-H), cetona (O=C-) o amino (-NH₂) y utilizando como aceptores de electrones a los cofactores NAD⁺ o NADP⁺. Las óxido-reductasas que participan en la esteroidogénesis se localizan en el citosol o en los microsomas, y en caso de la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, su actividad de deshidrogenasa está asociada con la actividad de Δ⁵-Δ⁴ isomerasa. En este grupo de enzimas

es común la presencia de isoenzimas.

El Colesterol.

El colesterol es el principal precursor de la biosíntesis de hormonas esteroides, a partir del cual se sintetizan progestágenos, andrógenos, estrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides. Las fuentes de colesterol son el plasma sanguíneo, los depósitos intracelulares en forma de ésteres y la síntesis *de novo* en el ovario.

El colesterol se transporta en la sangre asociado a lipoproteínas. Las células esteroideogénicas captan el colesterol mediante receptores membranales específicos. El colesterol no utilizado para la síntesis de esteroides es almacenado en forma de ésteres, por la acción de la enzima acil-CoA colesterol acil transferasa. La enzima colesterol-ester hidrolasa lo desesterifica para ser utilizado por la célula en la síntesis de hormonas esteroides (Díaz Zagoya y cols. 1988).

La síntesis *de novo* del colesterol involucra una serie de enzimas que utilizan al acetato como precursor. Dichas enzimas se localizan en el citoplasma y el retículo endoplásmico liso. El colesterol es una estructura de 27 átomos de carbono, que se forma a partir de la ciclización de una estructura lineal de 30 átomos de carbono (escualeno), involucrando una serie de modificaciones enzimáticas (figura 2). La estructura cíclica del colesterol (ciclopentanoperhidrofenantreno) es el núcleo esteroide que forma parte de todas las hormonas esteroides (figura 3).

Síntesis de Progesterona

Durante la biosíntesis de hormonas esteroides, las hormonas tróficas (gonadotropinas) activan una cadena de reacciones que conducen a la hidrólisis de los ésteres de colesterol por la colesterol-hidroxilasa en la membrana mitocondrial interna, donde el colesterol posteriormente es convertido a pregnenolona por el citocromo P450_{sc} (de sus siglas en inglés: side chain cleavage, que rompe la cadena lateral del colesterol) lo que involucra tres reacciones de hidroxilación, dos de las cuales ocurren en las posiciones

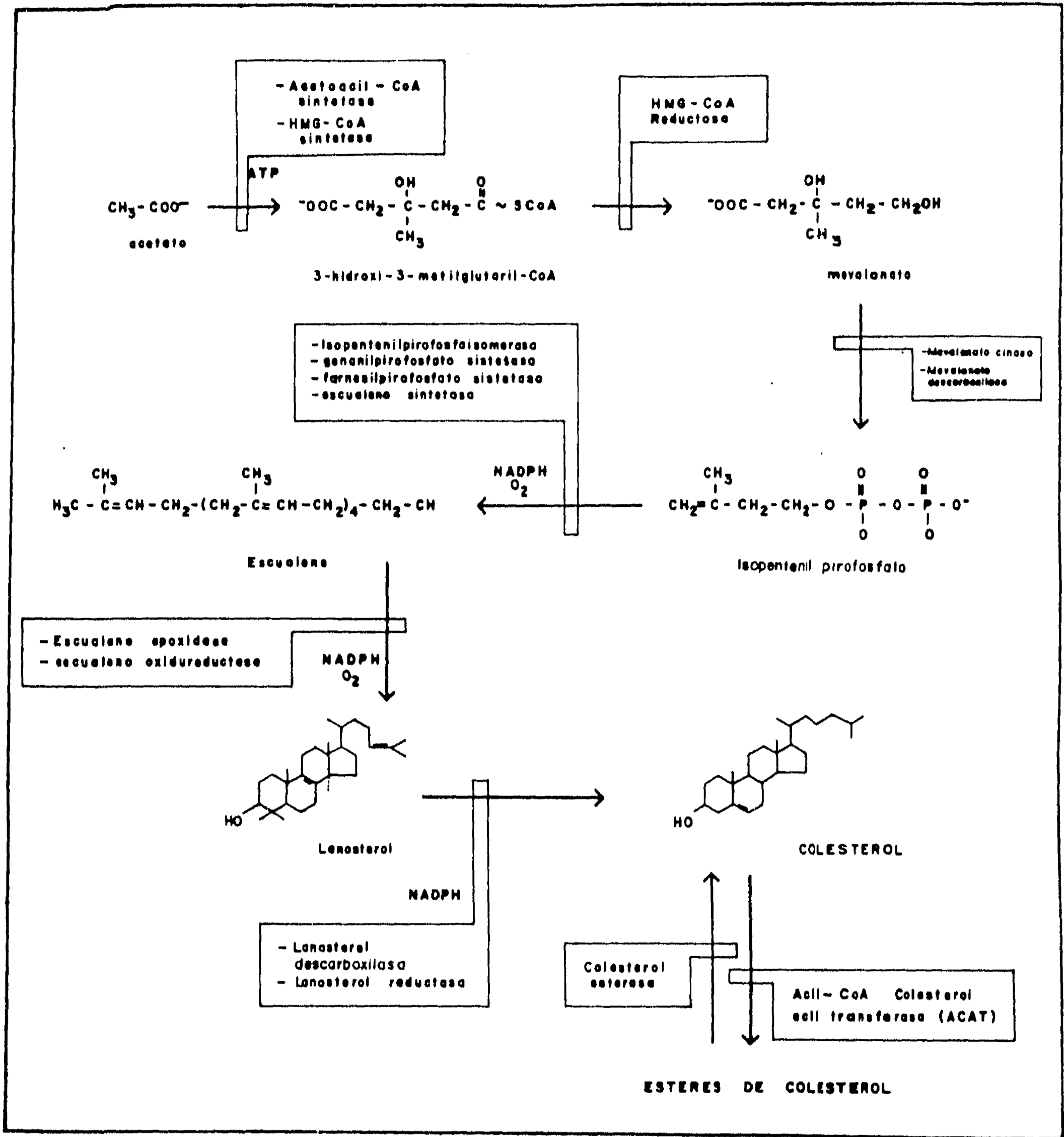


Figura 2. Esquema resumido que muestra la síntesis del Colesterol a partir de acetato, mostrando las enzimas involucradas.

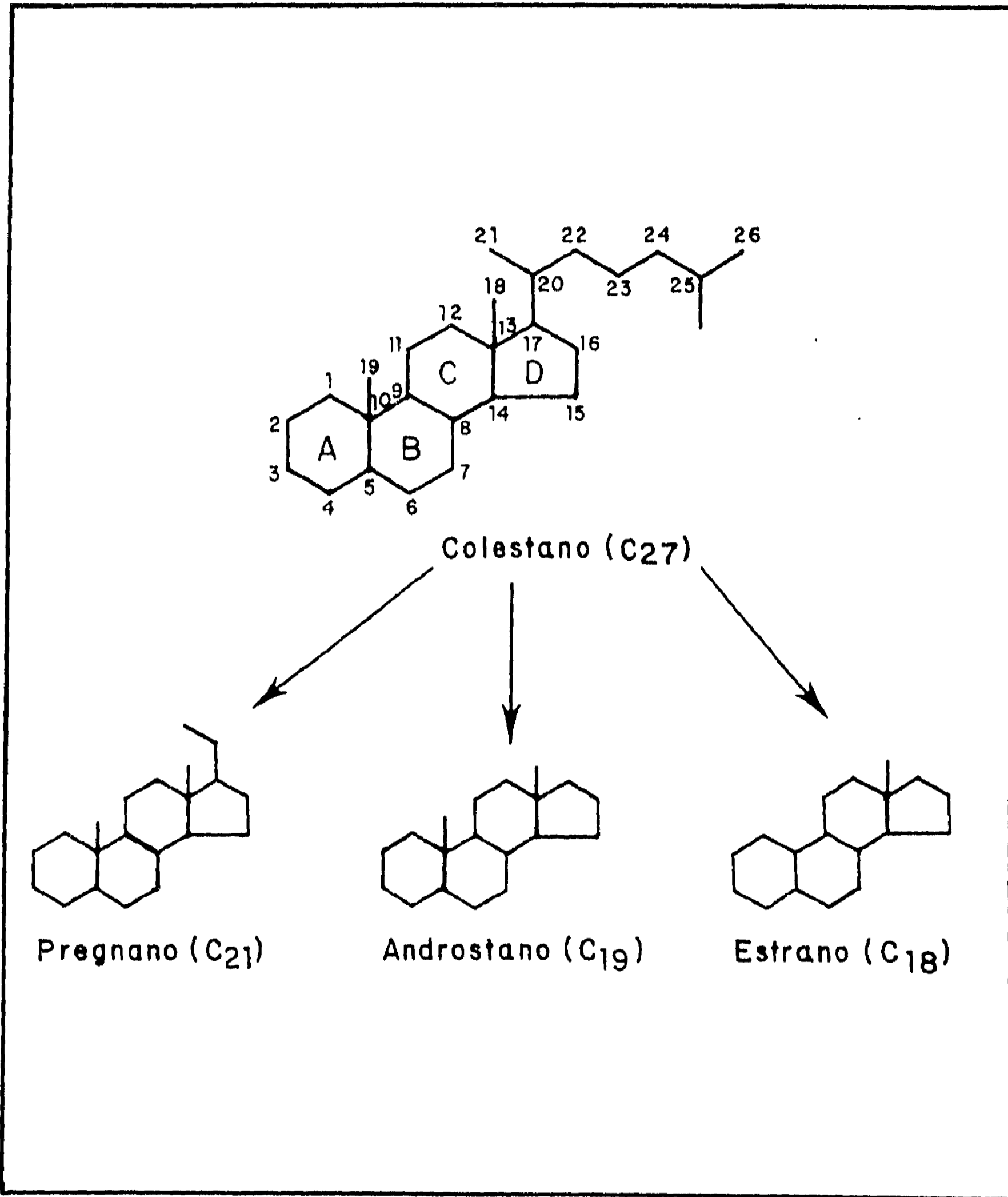


Figura 3. Nucleos esteroides básicos de los hidrocarburos esteroidogénicos producidos en el ovario. El subíndice indica el número de carbonos.

C-20 y C-22, y la tercera da como resultado la ruptura del enlace entre dichos carbonos produciendo pregnenolona y aldehído isocaproico (Tuckey y Atkinson, 1989) (figura 4). Se ha descrito que la transformación de colesterol a pregnenolona es el paso limitante en la vía esteroidogénica, principalmente para la producción de progesterona (Stone y cols., 1954) y que la concentración del citocromo P450_{11 α} es el principal factor que determina la velocidad de síntesis de pregnenolona (Tuckey y Atkinson, 1989; Rodgers y cols., 1986).

La pregnenolona es el intermediario clave en la síntesis de las hormonas esteroides producidas por los folículos ováricos. La biotransformación de pregnenolona en progestinas, andrógenos y estrógenos puede proceder a través de dos diferentes rutas metabólicas dependiendo del órgano endócrino y la especie (figura 5). Estas vías se han designado como Δ^4 y Δ^5 según la localización del doble enlace de los compuestos intermediarios. Independientemente de la vía utilizada existe la posibilidad de que una misma enzima reconozca a varios esteroides de 21 (pregnano) y 19 (androstano) átomos de carbono como sustratos (ver figura 3) (Díaz Zagoya y cols, 1988).

La progesterona es producida a partir de pregnenolona mediante un complejo enzimático microsomal, Δ^5 -3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), que utiliza NAD⁺ como aceptor de electrones (figura 5). Se han descrito por lo menos tres tipos distintos de 3 β -HSD que se expresan en diferentes tejidos en la misma especie y que reconocen los mismos sustratos, aunque con diferente afinidad (Hanukoglu, 1992), lo que ha permitido sugerir la existencia de iso-enzimas, moléculas estructuralmente diferentes capaces de reconocer estereoespecíficamente a un solo sustrato .

Por otra parte, se han localizado diferentes tipos de progestinas derivadas tanto de progesterona como de pregnenolona, que probablemente ejerzan un papel regulatorio sobre la síntesis de gonadotropinas hipofisiarias, como las progestinas 3 β ,5 β -reducidas (Díaz Zagoya y cols., 1988). En relación a la síntesis de estas progestinas, Wiebe y cols (1990) detectaron la actividad de varias oxidoreductasas en células de la granulosa de folículos ováricos de ave, que reducen en las posiciones 3 α , 5 β , 20 α y 20 β , del anillo esteroide.

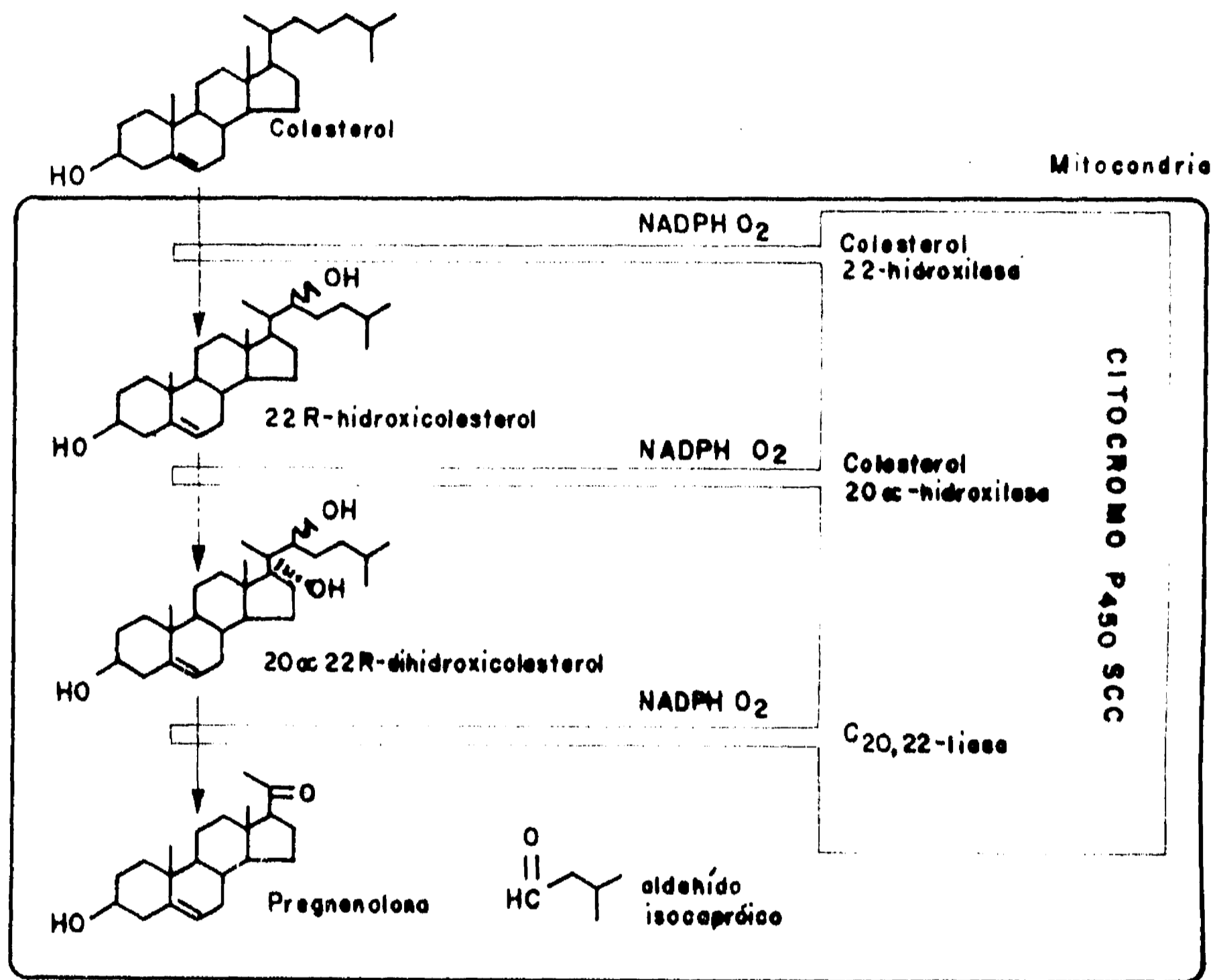


Figura 4. Vía de síntesis de la pregnenolona a partir de colesterol, ilustrando el mecanismo de ruptura de la cadena lateral del colesterol en la mitocondria. El sistema enzimático involucrado en el citocromo P450_{sc}.

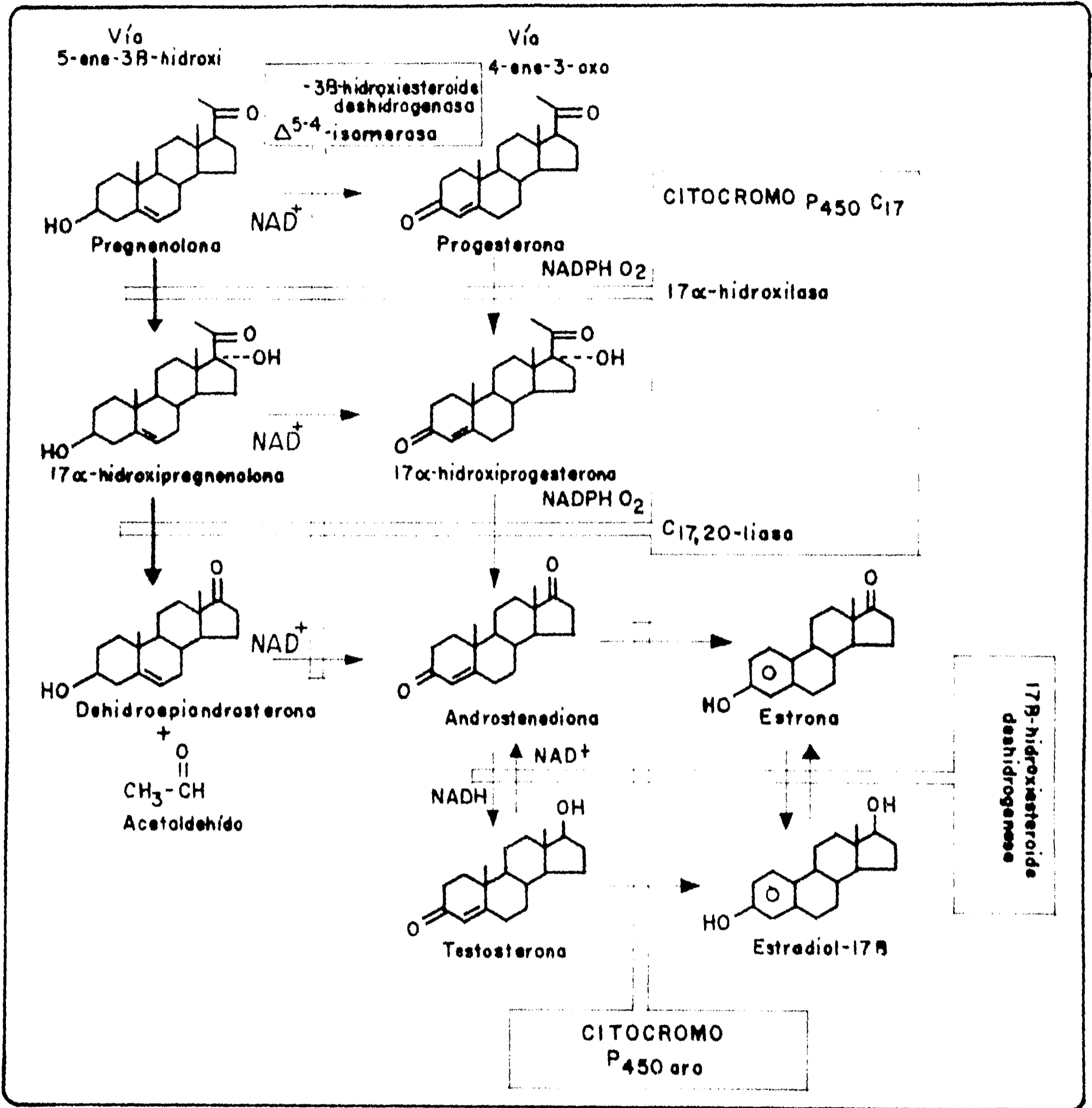


Figura 5. Vías Δ^5 y Δ^4 de la síntesis de andrógenos y estrógenos, a partir de Pregnenolona, en los microsomas. Las flechas gruesas indican el camino preferente para la síntesis de andrógenos en el ovario. Se muestran los complejos enzimáticos involucrados.

utilizando progesterona como precursor.

Síntesis de Andrógenos

En el folículo, un paso limitante en la transformación de pregnenolona y progesterona a andrógenos en el folículo, es la actividad del complejo enzimático P450_{c17} que involucra dos reacciones: a) 17 α -hidroxilación de los esteroides C21 y b) ruptura del enlace C17-C20. La primera actividad enzimática da como resultado las progestinas 17 α -hidroxiladas, y la segunda, DHEA y androstendiona (ver figura 5).

La testosterona es el producto de la transformación de androstendiona, catalizada por la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD). Esta enzima también reconoce como sustrato a la DHEA produciendo 5-androst-ene-3 β ,17 β -diol, el cual también se transforma en testosterona por la acción de la 3 β -HSD. Si la actividad de 3 β -HSD es muy alta, entonces la DHEA se convierte primero en androstendiona y posteriormente la 17 β -HSD transforma la androstendiona en testosterona. La enzima 17 β -HSD realiza la conversión reversible de los grupos 17-ceto y 17 β -hidroxi y la dirección de esta reacción está determinada la concentración del sustrato y el cofactor utilizado. Para la interconversión entre androstendiona y testosterona, la 17 β -HSD utiliza preferentemente NADPH; algunas isoenzimas de la 17 β -HSD con especificidad para andrógenos o para estrógenos utilizan NADH como cofactor (Hanukoglu, 1992).

Síntesis de Estrógenos

La biosíntesis de estrógenos se efectúa a partir de los andrógenos por intermedio de una secuencia de reacciones enzimáticas, genéricamente conocida como aromatización, lo que indica la transformación del anillo A de los andrógenos a un anillo con tres pares de electrones deslocalizados que forma parte de la estructura de los estrógenos. La aromatización requiere de tres oxidaciones sucesivas que utilizan el NADPH como cofactor y el complejo enzimático P450_{ar}, localizado en el retículo endoplásmico. Aunque no se conoce exactamente el mecanismo de la reacción de aromatización, a "grosso modo" puede hacerse una breve descripción. Se realizan dos hidroxilaciones sucesivas en el C-19. No se

conoce el sitio exacto de la tercera oxidación, pero finalmente es resultado es la remoción del grupo metilo unido al C-10 en forma de ácido fórmico, seguida por el rearrreglo de los electrones en el anillo A.

REGULACION DE LA ESTEROIDOGENESIS FOLICULAR

El concentración de hormonas sexuales en la sangre está regulada principalmente por cuatro procesos (Hanukoglu, 1992): a) la cantidad de enzima, determinado por la transcripción, la estabilidad de los RNAm y la traducción; b) actividad enzimática, modulada por las modificaciones postraduccionales de la enzima, condiciones del medio intracelular y disponibilidad de cofactores; c) disponibilidad de sustrato, determinada principalmente por la movilización de colesterol y su transporte al P450 mitocondrial que cataliza el primer paso en la vía esteroideogénica; y d) crecimiento de tejido que depende de las multiplicaciones celulares.

En la regulación de estos procesos participan diversos factores que pueden ser producidos por el ovario mismo o por otros órganos, como la hipófisis.

EL PAPEL DE LAS GONADOTROPINAS

El patrón de crecimiento y maduración de los folículos ováricos es regulado por las gonadotropinas, las cuales son secretadas por la hipófisis anterior o adenohipófisis y son transportadas por la sangre hasta al ovario.

Las gonadotropinas ejercen su acción mediada por receptores específicos localizados en la membrana plasmática de las células blanco. La señal hormonal se transmite al interior de la célula mediante un mecanismo de amplificación de la señal que requiere del adenosin monofosfato cíclico (AMPc) como segundo mensajero. La interacción hormona-receptor permite la activación de una enzima localizada en la membrana, la adenilato ciclasa, que transforma al adenosín trifosfato (ATP) en AMPc , utilizando Mg^{2+} como cofactor.

El AMPc regula varios procesos celulares al interaccionar con la proteína cinasa A

que cataliza la transferencia de un grupo fosfato a residuos de serina y treonina de ciertas proteínas presentes en las células, de tal manera que el efecto de las gonadotropinas se ve amplificado por una serie de reacciones en cascada.

La participación de las gonadotropinas en la regulación del proceso de maduración folicular en las aves ha sido estudiada por varios grupos de investigadores (Huang y Nalvandov, 1979; Hammond y cols, 1981; Calvo y Bahr, 1983; Kikuchi e Ishii, 1992). En el ovario, las gonadotropinas regulan la esteroidogénesis de las células foliculares. Uno de sus efectos es aumentar en la actividad y expresión de las enzimas involucradas en la biosíntesis (Tuckey y Atkison, 1989; McAllister y cols., 1990). Se ha informado que el aumento en la concentración de gonadotropinas en la sangre está relacionado con el crecimiento y desarrollo folicular. Además, se ha observado un marcado aumento en la concentración de la gonadotropina LH 4-6 horas antes de la ovulación en la gallina (Johnson y van Tienhoven, 1980; Etches y Cheng, 1981). La concentración de LH y hormonas sexuales en el plasma de gallina presenta variaciones cíclicas en un lapso de 24 horas, lo cual coincide con el período en que ocurre la ovulación (Wells y Gilbert, 1984).

Por otro lado, las concentraciones plasmáticas de la gonadotropina FSH, que son 20-30 veces menores que las de LH, no muestran fluctuaciones durante un ciclo ovulatorio (Scanes y cols., 1977b citado por: Wells y Gilbert, 1984). Se ha propuesto que el papel de la FSH en el ovario es principalmente estimular la biosíntesis de progesterona en las células foliculares en proceso de diferenciación (Hammond y cols. 1981; Calvo y Bahr, 1983) así como inducir la síntesis de los receptores a LH (Hillier, 1991).

MADURACION FOLICULAR

Existen varios factores que modulan la maduración de los folículos preovulatorios entre los que se consideran: los cambios en las concentraciones plasmáticas de las gonadotropinas circulantes, la síntesis y secreción de hormonas esteroideas y de factores de crecimiento por las células foliculares, y la expresión de receptores específicos en las células foliculares que median su interacción con factores externos.

En la gallina, los folículos en desarrollo se clasifican (como se describió antes) en varios grupos según su diámetro folicular y su color característico. Por día, a partir del grupo de los folículos amarillos pequeños (6-8 mm de diámetro) se selecciona uno sólo que continúa la maduración folicular y el resto se transforman en folículos atrésicos (Johnson, 1993). Se ha observado que la FSH participa en la selección del folículo y que los receptores para ésta se encuentran localizados únicamente en células de la granulosa de los folículos pequeños amarillos (Hillier, 1991; Hedin y cols., 1987). Poco después que se ha seleccionado el folículo, durante la transición de folículos pequeños amarillos a folículos preovulatorios pequeños (9-12 mm), las células de la granulosa adquieren la capacidad de responder a LH (Tilly y cols., 1991). En aves y mamíferos se ha observado que cuando las células de la granulosa se estimulan con FSH aumenta la actividad (Toaff y cols., 1983) y la expresión (Mulheron y cols. 1990; Tilly y cols., 1991) del citocromo P450_{scc}.

Por otra parte, los receptores para LH se localizan tanto en células de la teca como en células de la granulosa (Etches y Cheng, 1981). Las células de la teca de folículos pequeños amarillos, e incluso más pequeños, responden a LH (o a altas dosis de FSH) induciendo la actividad y expresión de los citocromos P450_{cl7} y P450_{aro} (Johnson, 1994).

Durante el desarrollo folicular, las células de la teca y de la granulosa secretan hormonas esteroides y factores de crecimiento, los cuales modulan la interacción entre las células foliculares. Kotsuji y cols. (1990) demostraron que en cocultivos de células de la teca y células de la granulosa se presentan cambios morfológicos en ambos tipos celulares inducidos por su interacción. Ellos observaron aumentos en el número de prolongaciones citoplasmáticas en las células de la granulosa e incrementos tanto en el número de células foliculares como en su actividad esteroidogénica. Por otro lado, aunque las células de la granulosa no producen andrógenos durante la maduración folicular, éstos influyen sobre su aspecto morfológico, durante la maduración folicular. Anderson, (1989) observó que los andrógenos pueden inducir cambios en las mitocondrias y el retículo endoplásmico liso de las células de la granulosa.

Otros factores involucrados en la regulación del desarrollo folicular y que son secretados por las células foliculares son los factores de crecimiento. Por ejemplo, estudios en el ovario de mamíferos han mostrado que el factor α transformante del crecimiento (TGF- α , por sus siglas en inglés) y el factor epidérmico de crecimiento (EGF, por sus siglas en inglés) son sintetizados predominantemente en células de la teca (Kudlow y cols., 1987; Skinner y cols., 1987 citados en: Johnson, 1994) y que las células de la granulosa contienen receptores para TGF- α (Skinner y Coffey, 1988). La FSH induce incrementos en las concentraciones de los mensajeros de los citocromos P450scc y P450c17 en las células de la granulosa. Cuando estas células se cultivan en presencia de FSH y TGF α o EGF no se observan incrementos en la concentración de dichos mensajeros (Tilly y cols., 1991). Con base en estas observaciones se ha sugerido que la interacción de los factores de crecimiento y la FSH con las células foliculares desempeñan un papel crítico en la selección del folículo que entrará en la fase final de crecimiento (folículos preovulatorios). Por otro lado, se ha mostrado que el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) también actúa como inhibidor del crecimiento y la diferenciación de las células de la granulosa de porcino que aún no presentan receptores a FSH. Sin embargo, la esteroidogénesis en las células de la granulosa que ya han sido estimuladas con FSH, se ve potenciada en presencia de TGF- β (Mondschein y cols., 1988).

Otro factor involucrado en el crecimiento y desarrollo de los folículos es el activador de plasminógeno (PA, por sus siglas en inglés), es cual es producido por las células foliculares. Tilly y cols. (1992) encontraron mayor actividad del PA en las células de la granulosa de los folículos amarillos pequeños, los cuales están en fase de crecimiento rápido, lo que coincide con una mayor incorporación de timidina.

Por otra parte, los cambios que se presentan en la producción de hormonas esteroides en el ovario de las aves durante el desarrollo folicular, dependen de la expresión y la actividad de las enzimas involucradas en la vía esteroidogénica. Los cambios que se han estudiado en las células foliculares durante la maduración, están relacionados con la respuesta de las células de la teca y de la granulosa a las gonadotropinas y con variaciones

en la producción de hormonas esteroides como consecuencia de dicha respuesta.

Las células de la teca de folículos en diferente estado de desarrollo son capaces de sintetizar progestinas, andrógenos y estrógenos (Tilly y Johnson, 1989), pero la cantidad de cada uno de ellos varía, de tal modo que los folículos corticales producen pequeñas cantidades de todos ellos. Al acercarse al período de la selección folicular, la cantidad de andrógenos y estrógenos secretados por las células de la teca va aumentando hasta que es mayor en los folículos preovulatorios pequeños y después disminuye hasta concentraciones indetectable en F1 (Velázquez y cols., 1991; Vértiz-Hernández y cols., 1993). La producción de andrógenos por las células de la teca interna disminuye con la maduración folicular, aparentemente debido a su menor sensibilidad hacia LH (Robinson y cols, 1986 en Tilly y Johnson, 1989; Marrone y cols, 1985a), pues se ha observado que las células de la teca interna de F5 presentan una respuesta cuatro veces mayor a LH que las células de la teca interna de F1 (Porter y cols., 1991).

En cambio, en las células de la granulosa estimuladas con gonadotropinas, la producción de progesterona aumenta aproximadamente tres veces del folículo F5 al F1. Las células de la granulosa de F5 responden principalmente a FSH para la síntesis de esteroides y sólo un poco responden al estímulo por LH. La respuesta a FSH por las células de la granulosa disminuye, mientras que la respuesta a LH aumenta. Finalmente, la síntesis de esteroides en las células de la granulosa de F1 está regulada por LH (Porter y cols., 1991).

ENZIMAS ESTEROIDOGENICAS DURANTE LA MADURACION FOLICULAR

Desmolasa del colesterol (citocromo P450_{sc})

Las células de la granulosa de folículos blancos pequeños del ovario de la gallina no producen progestinas debido en parte a que hay una supresión del RNAm del citocromo P450_{sc} (Kowalski y cols., 1991). Sin embargo, en folículos amarillos pequeños se observa que la concentración del mensajero y la actividad del complejo enzimático aumentan, inducidos principalmente por FSH (Toaff y cols., 1983; Wang & Greenwald, 1993). En las

preovulatorios pequeños (9-12 mm), la inducción del P450_{cc} se realiza principalmente por LH (Asem y cols, 1992; Li y Johnson, 1993). En células de la granulosa de folículos preovulatorios, la actividad de P450_{cc} es regulada principalmente por LH, y el grado de estimulación aumenta con la maduración.

Por otro lado, se ha observado que las células de la teca de folículos amarillos pequeños expresan mensajeros del P450_{cc} y presentan su actividad enzimática (Kowalski y cols., 1991). En un estudio inmunocitoquímico en folículos preovulatorios se observó reacción positiva para P450_{cc} en las células de la teca interna, pero no en las células de la teca externa; la reacción fue mayor en el folículo preovulatorio F3 (Nitta y cols., 1991).

3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD)

No se tiene información sobre la actividad de 3 β -HSD en células de la granulosa de folículos blancos grandes, que son menores de 6 mm (cuyo crecimiento es muy lento). En cambio, se ha informado, que las células de la granulosa de folículos amarillos pequeños presentan actividad de 3 β -HSD, ya que fueron capaces de convertir pregnenolona en progesterona (Tilly y cols., 1991). Se ha observado, mediante estudios de inmunocitoquímica, que las células de la granulosa de folículos preovulatorios pequeños presentan reacción positiva para 3 β -HSD y que la cantidad aumenta con la maduración folicular (Nitta y cols., 1993).

Por otro lado Nitta y cols. (1993) observaron que la teca de folículos blancos grandes presenta alta inmunoreactividad para 3 β -HSD. En los folículos amarillos pequeños observaron reacción para dicha enzima en las células de la teca completa, la cual posteriormente se va compartamentalizando en la teca interna. Después de la selección folicular, en los folículos preovulatorios, la inmunoreactividad de 3 β -HSD en la teca externa desaparece completamente y en la teca interna, disminuye gradualmente hasta casi desaparecer en F1.

C-17 hidroxilasa/liasa (citocromo P450_{c17})

En las células de la granulosa de folículos blancos grandes, amarillos pequeños y perovulatorios pequeños, Li y cols. (1993a) observaron expresión de RNA mensajero para el citocromo P450_{c17}. La expresión génica de P450_{c17} disminuye en los folículos preovulatorios mayores, de modo que en F1 es cinco veces menor que en F5. Se ha observado que en las células de la granulosa de los folículos amarillos pequeños, la FSH, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), o ambos inducen la expresión génica y la actividad del P450_{c17}.

Por otra parte, se ha mostrado que las células de la teca completa de folículos pequeños amarillos y las células de la teca interna de folículos preovulatorios, expresan el mensajero de P450_{c17}. Además, se ha informado que la concentración del mensajero disminuye con la maduración folicular (Kato y cols., 1995). Por otra parte, se ha observado mediante inmunocitoquímica reacción positiva para P450_{c17} en células intersticiales de la teca interna y en las células tipo fibroblasto de la teca externa de los folículos preovulatorios. La reacción es más intensa en F5 y F3 y disminuye casi a la mitad en F1 (Nitta y cols, 1991).

Aromatasa (P450_{aro})

No se ha detectado la actividad del complejo enzimático P450_{aro} en las células de la granulosa de folículos del ovario de aves, en cualquier estado de desarrollo.

En cambio, en las células de la teca completa de los folículos preovulatorios pequeños se ha detectado la actividad de aromatasa cuando las células se incuban con 25-hidroxicolesterol (Tilly y cols., 1991). Existen varios informes que indican que la actividad de aromatasa folicular se localiza sólo en las células de la teca externa de folículos preovulatorios, pues únicamente en éstas se ha observado la producción de 17 β -estradiol (Porter y cols., 1989; Nitta y cols., 1991; Velázquez y cols., 1991; Kato y cols., 1995). Estudios de inmunoreactividad apoyan lo antes observado en la teca externa de folículos preovulatorios, ya que se observó reacción positiva para P450_{aro} solamente en los islotes de células epiteliales poco diferenciadas. La inmunoreactividad fue más intensa en F5 y casi desapareció en F1 (Nitta y cols, 1991). Estos islotes ya no se observan en la teca externa de

los folículos F2 y F1. Además, estudios de expresión génica apoyan los datos anteriores, pues se ha podido detectar el RNA mensajero para P450_{aro} en células de la teca de folículos amarillos pequeños y en las células de la teca externa de folículos preovulatorios F4 y F3, mas no en la teca externa de F2 y F1 (Kato y cols., 1995).

TEORIA BICELULAR

En relación a la maduración de los folículos preovulatorios se ha postulado que la interacción entre las células foliculares en la síntesis de hormonas esteroides, permite regular el desarrollo del folículo. Con base en esta interacción se ha propuesto una teoría bicelular o multicelular, en concordancia con el número de poblaciones celulares implicadas.

Huang y cols. (1979) mostraron los primeros indicios para postular una teoría bicelular, basada en la secreción de esteroides por los folículos preovulatorios mayores de la gallina (F1-F3). El modelo propone que las células de la granulosa y las células de la teca actúan de manera concertada en la producción de hormonas esteroides, de tal modo que las células de la granulosa producen principalmente progesterona y que las células de la teca son la principal fuente de andrógenos y estrógenos ováricos. Estos datos son apoyados por otros estudios (Barh, y cols., 1983; Jonhson, 1993; Etches y Duke, 1984).

Posteriormente se propuso un modelo multicelular en la producción de hormonas esteroides por los folículos preovulatorios del ovario de gallina, basado en la localización inmunocitoquímica de los complejos enzimáticos P450 involucrados en la esteroidogénesis (Nitta y cols, 1991), así como en la cuantificación por radioinmunoanálisis de las hormonas esteroides producidas (Porter y cols., 1989). Este modelo propone la existencia de una interacción entre células de la granulosa, la teca interna y la teca externa. La progesterona producida por las primeras células se metaboliza a andrógenos en la teca interna y éstos son aromatizados por la células de la teca externa.

Varios estudios han apoyado este modelo. Cuando se han aislado cada una de las poblaciones de células esteroidogénicas foliculares se ha observado que son capaces de

sintetizar esteroides sin necesidad de otras interacciones celulares, y solamente requieren la estimulación con gonadotropinas. Sin embargo, cuando se cocultivan dos tipos de células foliculares las cantidades detectadas son diferentes respecto a las observadas al cultivar un sólo tipo celular. Es decir, cuando se cocultivan células de la granulosa con células de la teca se observa mayor producción de androstendiona que la detectada en la teca aislada, y menor producción de Progesterona que la observada en las células de la granulosa aisladas (Marrone y cols, 1983; Kotsuji y cols, 1990). Cuando se cocultivan células de la teca interna con células de la teca externa, la producción de testosterona disminuye en relación a la producida sólo por células de la teca interna, en tanto que la producción de 17β -estradiol aumenta comparado con el producido por la teca externa sola (Porter y cols, 1989).

Otra evidencia que apoya el modelo multicelular, es que las células de la teca de folículos preovulatorios de gallina presentan receptores para progesterona (Yoshimura, 1991). El papel de la progesterona podría ser el de estimular el rápido crecimiento del folículo ya que los receptores a progesterona se localizan principalmente en células indiferenciadas (tipo fibroblasto) de la teca externa.

Finalmente, el hecho de que sólo las células de la granulosa presentan receptores para FSH, y que la FSH sola es capaz de inducir indirectamente los receptores a LH sobre tejido tecal de manera sinérgica con el estradiol en los folículos preovulatorios (Wang y Greenwald, 1993), permite suponer que existen otros factores que de manera parácrina regulan la esteroidogénesis folicular.

JUSTIFICACION

En el folículo ovárico de las aves la capa granulosa produce principalmente progesterona, mientras que la producción de andrógenos y estrógenos se encuentra en la capa de la teca. La teca folicular se compone por la teca interna y la teca externa. En la teca interna se encuentran células esteroideogénicas típicas que participan en la secreción de andrógenos; en la teca externa encontramos islotes de células epiteliales poco diferenciadas que tienen la capacidad de transformar los andrógenos aromatizables a estrógenos.

Por otra parte, la cantidad y el tipo de hormona esteroide producida por el folículo ovárico cambia durante su maduración. En los folículos preovulatorios pequeños la capa granulosa produce menor cantidad de progesterona que la observada en el folículo maduro. A la inversa, la secreción de andrógenos y estrógenos es mayor en los folículos pequeños y se reduce con la maduración.

No hay indicios sobre las vías metabólicas en la síntesis de esteroides localizadas en la teca externa, ni se conocen los cambios que se producen sobre la actividad de las enzimas esteroideogénicas durante la maduración folicular. Este conocimiento permitirá entender mejor la producción de esteroides sexuales por el folículo ovárico y los mecanismos que regulan su biosíntesis.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar las capacidades esteroideogénicas de las células de la teca externa de folículos preovulatorios de gallina.

PARTICULARES

1. Aislar, con alto grado de pureza, las células de la teca externa de folículos preovulatorios del ovario de gallina.
2. Determinar la presencia de las enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroides en las células de la teca externa aisladas, desde pregnenolona hasta estrógenos .

HIPOTESIS

La teca externa participa en el metabolismo de hormonas esteroides ováricas de una manera diferente a lo observado en la teca interna, particularmente en la producción y aromatización de andrógenos.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

Se usaron como precursores los siguientes esteroides: [7-³H(N)]-pregnenolona (23.5 Ci/mmol), [1,2,6,7-³H(N)]-progesterona (94.1 Ci/mmol), [1,2,6,7-³H(N)]-dehidroepiandrosterona (89.8 Ci/mmol), [1,2,6,7-³H(N)]-androst-4-en-3,17-diona (93.0 Ci/mmol) y [1,2,6,7-³H(N)]-testosterona (93.9 Ci/mmol), los cuales se adquirieron de Du Pont Co. NEN Research Products (Boston, M.A.).

El medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y la tripsina se obtuvieron de Grand Island Biological Co. (Grand Island, N.Y.). El inhibidor de tripsina de soya, albúmina de suero de bovino (BSA), la 1-metil-3-isobutil xantina (MIX) y la gonadotropina coriónica humana (hCG) se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St Louis, M.O.). Los estándares que se utilizaron (ver anexo 1) se obtuvieron de Steraloids (Wilton, N.H.).

La cromatografía en capa fina se realizó en cromatofolios de aluminio de sílica gel G-60 con indicador fluorescente F₂₅₄ y la purificación de los precursores tritiados fue realizada en cromatoplasmas de sílica gel 60 sin indicador fluorescente, ambas obtenidas de Merck (México). Todos los disolventes usados fueron de grado analítico y redestilados antes de ser empleados.

METODOS

Material biológico

Se utilizaron gallinas adultas blancas de la cepa Leghorn (Babcock B-300) obtenidas de la granja de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, de 40-60 semanas de edad, mantenidas bajo ciclos 14-10 horas, luz-oscuridad.

Se obtuvieron los folículos preovulatorios del primero al sexto en tamaño decreciente

(F1-F6), disecándolos cuidadosamente del ovario de animales muertos por dislocación cervical, 6-8 hrs después de la ovulación. La ovulación fue determinada según el procedimiento utilizado por Velázquez y cols. (1991). Se seleccionaron los folículos F1, F3 y F5 con diámetro promedio de 35.1 ± 1.7 mm, 25.5 ± 1.7 mm y 13.4 ± 0.22 mm, respectivamente.

Obtención de células de la teca externa

Las capas celulares de la granulosa y de la teca fueron separadas según el método de Gilbert y cols. (1977). Para ello se realizó un corte con una navaja de afeitar, de 1-2 cm a lo largo de la línea del estigma de cada folículo y se vació rápidamente el contenido folicular (constituido por la yema, capa perivitelina, capa de las células de la granulosa y capa basal). El resto del folículo se colocó inmediatamente en una caja de Petri con solución amortiguadora de fosfatos libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (PBS), pH 7.4 (ver anexo). Con ayuda de un microscopio estereoscópico se liberó el tejido conectivo y vasos sanguíneos del exterior del folículo utilizando tijeras de disección. Posteriormente, las capas foliculares que quedaron se evertieron y se lavaron con la solución amortiguadora. En estas condiciones, los restos foliculares contenían solamente a la teca interna al exterior y a la teca externa al interior.

La separación entre la teca interna y la teca externa se realizó según el método de Porter, y cols. (1989). Brevemente, las capas de la teca (restos foliculares), se incubaron en tripsina (2.5 mg/ml en PBS) a 37°C en baño maría con agitación (90 ciclos/min), en volumen de 6-8 ml en un matraz Erlenmeyer. El tiempo de incubación con tripsina fue de 3-10 min dependiendo del tamaño del folículo. Durante dicha incubación la teca interna se vuelve un tejido laxo, que puede ser removido fácilmente con un bisturí, quedando únicamente la capa de la teca externa. Esta capa se lavó con PBS y se incubó en las condiciones antes mencionadas, en un volumen de 6-8 ml de solución de tripsina, durante 5-10 min. Durante la incubación se hizo pasar el tejido a través de una pipeta, cada 3-5 minutos, hasta disgregarlo totalmente. Para inhibir la actividad de la tripsina se agregó un volumen igual de inhibidor de tripsina (5.0 mg/ml en DMEM) con 1.0 mg/ml de albúmina de suero de

bovino (BSA). Posteriormente el tejido disgregado se pasó a través de una malla de nylon para eliminar fragmentos de tejido.

La suspensión celular obtenida se lavó con dos volúmenes de 10 ml de DMEM-BSA, centrifugando a 1000 rpm durante 10 min, en cada cambio. La viabilidad celular se determinó por la prueba de exclusión de azul de tripano (Tennant, 1964). Al final de la separación y de la disgregación, las células de la teca externa de cada folículo se obtuvieron con una pureza mayor del 90% y una viabilidad mayor del 95%.

Para comparar las características morfológicas de las células de la teca interna y de la teca externa, se realizó la fijación de cada población obtenida del folículo F5. Las células obtenidas de cada capa tecal fueron fijadas con glutaraldehído al 2% en amortiguador de cacodilatos 0.15M a un pH de 7.4, durante dos horas. Después de un lavado con amortiguador, se postfijó con tetróxido de osmio al 1% en el mismo amortiguador por un lapso de 45 minutos a temperatura ambiente. El botón celular se deshidrató gradualmente con etanol-agua en diferentes concentraciones. Los botones deshidratados se incluyeron en resina epóxica Poly/bed (Polyscience). Se realizaron cortes semifinos de cada botón, se tiñeron con azul de toluidina y se observaron al microscopio óptico.

Metabolismo de hormonas esteroides

Para determinar la capacidad de la teca externa para metabolizar esteroides durante la maduración folicular, se utilizaron los precursores enlistados en la sección de materiales. La pureza de dichos precursores se determinó previamente, y en caso de ser menor del 90% se purificaron mediante cromatografía en capa fina, utilizando cromatoplasmas de sílica gel 60 sin indicador fluorescente. El sistema de elución utilizado fue diclorometano:acetato de etilo (Diel:AcEt) [8:2 (v/v)].

Se incubaron 5×10^5 células de cada folículo por duplicado en un volumen de 1 ml de DMEM-BSA (pH=7.4) con 0.1 mM de MIX, con 1.0 UI de hCG y con un precursor esteroide radiactivo (100,000 cpm). La incubación se realizó durante 15 min, a 37°C en baño

maría con agitación (90 ciclos/min), en viales nuevos. La adición de hCG y MIX tuvo por objeto colocar a las células en una situación de máxima estimulación esteroideogénica.

Al final de la incubación se agregaron 10 ml de éter etílico frío por vial, mezclando por agitación durante 20 segundos en el vortex. Posteriormente, los viales se guardaron a -45°C hasta que se realizó la extracción. Con el éter, la muestra se separa en dos fases, la inferior acuosa y la superior orgánica. Para separarlas, la fase acuosa se congeló por inmersión del vial en una mezcla frigorífica de acetona-hielo seco y se decantó la fase orgánica a otro vial. Se repitió la extracción con 10 ml de éter, dos veces, recogiendo la fase orgánica de cada extracción en el mismo vial inicial. Por último, se evaporó el disolvente orgánico en baño maría a 37°C , hasta sequedad. El extracto final se almacenó a temperatura ambiente hasta la purificación de los metabolitos.

La purificación de los metabolitos se realizó mediante cromatografía en capa fina utilizando cromatofolios de aluminio con sílica gel G-60, conteniendo indicador fluorescente, lo que facilita la identificación de los metabolitos con doble ligadura en el C4. En la placa se marcaron zonas de 15 mm para la aplicación de los estándares y cada una de las muestras. Se aplicaron aproximadamente $20\ \mu\text{g}$ de cada uno de los estándares de los esteroides utilizados (ver apéndice) en las zonas indicadas y además se aplicaron como acarreadores $0.5\text{-}1.0\ \mu\text{g}$ de los mismos en las zonas marcadas para cada muestra, como acarreadores. Posteriormente, cada extracto final se resuspendió en 0.1 ml de etanol puro (Merck, México) y se aplicó una alícuota de 0.05 ml en la zona indicada en la cromatoplaça. La cromatografía se desarrolló en uno o dos sistemas de disolventes, según fue necesario. La indentificación de los metabolitos se realizó con base en la localización de los estándares en la placa mediante el revelado con luz ultravioleta y con ácido sulfúrico-agua (10%), calentando a 120°C .

En la placa se señalaron las zonas de cada uno de los metabolitos localizados y se cortaron los fragmentos que los contenían. Cada fragmento fue colocado en un vial donde posteriormente se le agregaron 10 ml de líquido de centelleo (ver anexo). Finalmente, se

contó la radiactividad en un contador de centelleo líquido Beckman LS-6000. Debido a que la recuperación de la radiactividad fue de 85-95% no se hicieron correcciones en los cálculos de la producción de los esteroides. En todos los casos se calculó el porcentaje de transformación para cada metabolito identificado, según lo descrito por Juárez-Oropeza y cols. (1993).

Para la separación cromatográfica de los metabolitos producidos a partir de [1,2,6,7-³H(N)]-dehidroepiandrosterona, [1,2,6,7-³H(N)]-androstendiona y [1,2,6,7-³H(N)]-testosterona se utilizó el sistema de solventes de diclorometano:acetato de etilo 8:2 (v/v). En tanto que para purificar los productos del metabolismo de las progestinas, [1,2,6,7-³H(N)]-progesterona y [7-³H(N)]-pregnenolona, se utilizó el sistema éter isopropílico-hexano-ácido acético 70:30:2 (v/v/v) en los primeros experimentos. En otra serie de experimentos sobre el metabolismo de progestinas, se utilizó el sistema diclorometano:acetato de etilo 8:2 (v/v). Los resultados con el último sistema fueron más reproducibles. Sin embargo, varias progestinas presentaron RFs iguales o semejantes en dicho sistema. En consecuencia, se utilizó la recristalización para la identificación final de las progestinas producidas.

Las recristalizaciones se realizaron utilizando esteroides estándares. Para ello, se incubaron 5×10^5 las células con 0.36 μ Ci de cualquiera de los dos precursores radiactivos, en las mismas condiciones que se describieron anteriormente. Se realizó la extracción de la manera indicada y el extracto de cada muestra se resuspendió con 0.3 ml de etanol. En un tubo se colocaron 20-25 mg del estándar que se deseaba identificar y se disolvió en 1.5-6.0 ml de metanol destilado (Merck, México). Posteriormente, se mezcló una alícuota de 0.1 ml del extracto resuspendido con el estándar solubilizado. Se agregó el volumen mínimo necesario de agua para conseguir la recristalización del esteroide. Para separar los cristales del disolvente se centrifugaron a 1000 rpm durante 20 min. En el sobrenadante (aguas madres) se determinó la radiactividad total y los cristales se secaron a 80 °C en una estufa con vacío. Los cristales secos se pesaron para determinar la recuperación y se volvieron a disolver en un volumen mínimo de metanol. Se tomó una pequeña alícuota para determinar la radiactividad total de los cristales. Las cristalizaciones se repitieron 4 ó 5 veces.

Previo análisis de varianza, para el análisis estadístico de los datos del metabolismo de pregnenolona, progesterona, dehidroepiandrosterona y testosterona se aplicó la prueba de rango múltiple de Tukey utilizando el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc. Cary, NC). El análisis de los datos del metabolismo de androstendiona se realizó utilizando el paquete estadístico Software SPSS. Para analizar estos datos, también se aplicó la prueba de Tukey, pero sobre los datos homogenizados. Además, debido a que se encontró gran variabilidad entre una serie de experimentos y otra, los datos del metabolismo de androstendiona se reagruparon considerando experimentos semejantes y se compararon los grupos entre sí.

Para aceptar que las diferencias entre las medias eran estadísticamente significativas, se requirió de un valor de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Características morfológicas.

En la figura 6 se muestran los tipos celulares presentes en la teca interna y en la teca externa. La teca interna presenta gran cantidad de células con abundantes gotas lipídicas, muchos eritrocitos, lo cual está en relación con la abundante vascularización, característica de la teca interna. La teca externa presenta células de tipo fibroblasto con prolongaciones citoplasmáticas (dichas prolongaciones le dan un aspecto veloso a las células) y una proporción menor de células sin características distintivas, que corresponden a las células epiteliales poco diferenciadas, descritas por Velázquez y cols. (1991). Fue raro observar eritrocitos en la teca externa, pero sí se encontraron algunas células con inclusiones lipídicas.

Metabolismo de Pregnenolona

Cuando se utilizó pregnenolona como precursor se identificaron metabolitos, 5-pregnen-3 β ,20 β -diol (pregnendiol) y progesterona. Los porcentajes de transformación a pregnendiol fueron de 47%, 39% y 24%, para los folículos F5, F3 y F1, respectivamente; mientras que los porcentajes de transformación a progesterona fueron 2.4% para F5, 2.3% para F3 y 1.3% para F1 (tabla 1). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tipos de folículos, en la producción de metabolitos a partir de pregnenolona.

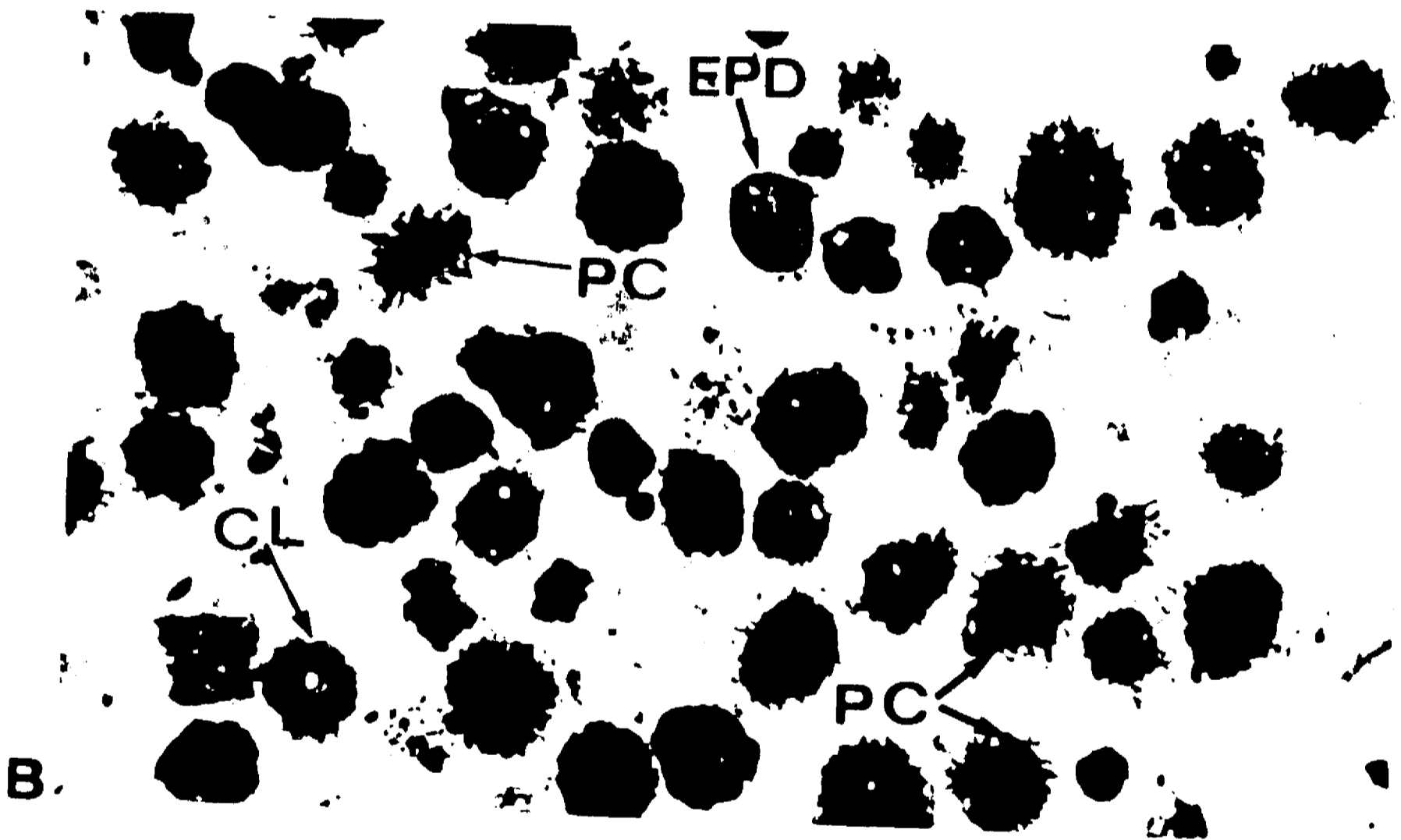


Figura 6. Detalle al microscopio óptico en cortes de $1\mu\text{m}$ de grosor de teca interna y teca externa. A.- Tipos celulares de la suspensión de la teca interna, donde se distinguen células con lípidos (CL) y entre ellas se observan eritrocitos (E). B.- Suspensión celular de la teca externa. Se observan células con prolongaciones citoplasmáticas (PC) con escasas inclusiones lipídicas y células epiteliales poco diferenciadas (EPD). 625 X.

FALLA DE ORIGEN

Metabolismo de Progesterona

A partir de progesterona únicamente se detectó 20 β -dihidroprogesterona (20 β -DHP) con porcentajes de transformación de 52%, 34% y 49% para F5, F3 y F1, respectivamente (tabla 1). El porcentaje de acumulación de este metabolito fue significativamente mayor cuando las células se obtuvieron de folículos en F5 que en F3, mientras que en los obtenidos de las células de los folículos F1 fue similar a los de F5 y F3.

Metabolismo de Dehidroepiandrosterona

El principal metabolito obtenido a partir de dehidroepiandrosterona (DHEA) fue androstendiona con un porcentaje de transformación de 29% para F5, 23% para F3, y 10% para F1. Además, se detectó estrona con porcentaje de transformación de 1.5% para F5, 0.9% para F3 y 0.4% para F1 (tabla 2). No se observaron diferencias significativas en la producción de androstendiona entre F5 y F3, pero en F1 la diferencia fue significativa respecto a los otros dos. La producción de androstendiona fue mayor en los folículos más pequeños ($p < 0.05$). Por otro lado, no hubo diferencias significativas entre los folículos para la producción de estrona.

Testosterona

Cuando se utilizó testosterona como precursor se encontró un porcentaje de transformación muy alto hacia androstendiona: 50%, 50% y 30% para las células obtenidas de los folículos F5, F3 y F1, respectivamente (tabla 2). Se observa disminución en la producción de androstendiona a medida que el folículo crece, aunque sólo se observaron

TABLA 1.
METABOLISMO DE PREGNENOLONA Y PROGESTERONA EN
CELULAS DE LA TECA EXTERNA DE FOLICULOS PEOVULATORIOS
DE GALLINA.

SUSTRATO/ Metabolitos	PORCENTAJE DE TRANSFORMACION		
	F5	F3	F1
PREGNENOLONA			
Progesterona	2.4 ± 2.7 ^A	2.3 ± 1.7 ^A	1.3 ± 1.0 ^A
Pregnendiol	46.5 ± 16.9 ^A	38.9 ± 20.8 ^A	24.4 ± 7.5 ^A
P ₅ residual	18.3 ± 6.4	27.2 ± 13.6	54.6 ± 2.2
NI	18.2	13.4	3.4
PROGESTERONA			
20β-DHP	52.1 ± 2.8 ^A	33.6 ± 13.4 ^B	49.4 ± 3.4 ^{AB}
P ₄ residual	31.1 ± 8.4	52.4 ± 14.3	30.5 ± 4.2
NI	1.5	1.7	6.2

Células de la teca externa de folículos preovulatorios de diferentes tamaños: F5 (diámetro 11-15mm), F3 (diámetro 23-27mm), y F1 (diámetro 33-38mm).

Tiempo de incubación: 15 minutos.

Los valores representan la media ± dem; n= 6, para el metabolismo de pregnenolona, n= 4 para el metabolismo de progesterona.

^{A, B} valores estadísticamente diferentes (p < 0.05) entre las distintas poblaciones celulares, para un mismo metabolito.

P₅ = pregnenolona; P₄ = progesterona.

NI = metabolitos no identificados. Se presentan únicamente los promedios de NI.

TABLA 2.
METABOLISMO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA Y TESTOSTERONA
EN CELULAS DE LA TECA EXTERNA DE FOLICULOS
PREOVULATORIOS DE GALLINA.

SUSTRATO/ Metabolitos	PORCENTAJE DE TRANSFORMACION		
	F5	F3	F1
DHEA			
Androstendiona	28.9 ± 6.9 ^A	23.1 ± 3.9 ^A	10.5 ± 4.6 ^B
Estrona	1.5 ± 1.3 ^A	0.9 ± 0.8 ^A	0.4 ± 0.3 ^A
DHEA residual	60.6 ± 2.7	70.5 ± 0.9	82.1 ± 0.5
TESTOSTERONA			
Androstendiona	50.1 ± 10.6 ^A	49.6 ± 12.4 ^A	30.3 ± 15.0 ^B
Estrona	2.0 ± 1.3 ^A	1.0 ± 1.1 ^{AB}	0.5 ± 0.4 ^B
Estradiol	1.9 ± 1.7 ^A	1.7 ± 1.6 ^A	1.4 ± 2.3 ^A
T residual	35.3 ± 9.7	38.9 ± 12.2	56.1 ± 17.0

Células de la teca externa de folículos preovulatorios de diferentes tamaños: F5 (diámetro 11-15mm), F3 (diámetro 23-27mm), y F1 (diámetro 33-38mm).

Tiempo de incubación: 15 minutos. n = 7

Los valores representan la media ± dem.

^{A,B,C} valores estadísticamente diferentes (p < 0.05) entre las distintas poblaciones celulares, para un mismo metabolito.

diferencias significativas en las células obtenidas del folículo F1 ($p < 0.05$). También se observó transformación hacia estrona, con porcentajes de transformación de: 2.0% para F5, 1.0% para F3 y 0.5% para F1; y hacia 17β -estradiol con 1.9% para F5, 1.7% para F3 y 1.4% para F1. No se observó diferencia significativa entre las células obtenidas de los folículos F5 y F3 para la producción de androstendiona y sólo en las obtenidas de los folículos F1 fue diferente, mostrando una menor producción. La producción de estrona fue diferente entre las células de los folículos F5 y F1, mostrando disminución a medida que aumenta el tamaño folicular ($p < 0.05$).

Androstendiona

Se realizaron cuatro ensayos utilizando androstendiona como precursor y se pudieron detectar estrona, 17β -estradiol y testosterona. Para un mejor análisis, en la tabla 3 se muestran los datos individuales y los promedios de cada dos experimentos. Es necesario hacer notar que se observaron diferencias en cuanto a la producción de todos los metabolitos, entre los dos primeros ensayos y los dos últimos. Un hecho que llama la atención es que en los experimentos donde se detectó menor cantidad de estrona también se observó un ligero aumento en la producción de 17β -estradiol. Cuando se analizaron estadísticamente los datos agrupados por cada dos experimentos (con resultados semejantes) se observaron diferencias significativas entre folículos y entre metabolitos. En todos los ensayos la producción de estrona fue mayor que la de 17β -estradiol.

A continuación se muestran los promedios para cada metabolito de los datos de los

TABLA 3
METABOLISMO ANDROSTENDIONA EN CELULAS DE LA TECA
EXTERNA DE FOLICULOS PEOVULATORIOS DE GALLINA.

Metabolitos	PORCENTAJE DE TRANSFORMACION		
	F5	F3	F1
Testosterona	2.00	1.60	0.30
	3.00	0.90	0.40
	1.35	0.95	0.50
promedio ¹	1.25	1.15	0.40
	0.10	0.30	0.30
	0.10	0.60	0.40
	0.10	0.60	0.60
	0.10	0.40	0.90
promedio ²	0.10	0.47	0.55
Estrona	14.70	10.70	0.10
	8.95	12.00	0.10
	12.13	13.75	0.50
promedio ¹	11.92	12.15	0.23
	2.50	0.30	0.10
	3.20	0.50	0.10
	3.70	0.40	0.10
	4.70	0.40	0.10
promedio ²	3.52	0.40	0.10
Estradiol	0.10	0.10	0.10
	0.10	0.10	0.10
	1.60	1.80	2.30
promedio ¹	0.60	0.66	0.83
	1.70	2.30	1.70
	3.80	4.50	0.30
	2.10	1.20	0.30
	2.80	0.50	0.10
promedio ²	2.60	2.12	0.60

Células de la teca externa de folículos preovulatorios: F5 (diámetro 11-15mm), F3 (diámetro 23-27mm) y F1 (diámetro 33-38mm). Valores individuales (n=7). Tiempo de incubación 15min. ¹ = promedio de los dos primeros experimentos. ² = promedio de los dos últimos experimentos.

TABLA 4.
METABOLISMO DE ANDROSTENDIONA EN CELULAS DE LA TECA
EXTERNA DE FOLICULOS PREEVULATORIOS DE GALLINA.

Metabolitos	PORCENTAJE DE TRANSFORMACION		
	F5	F3	F1
Testosterona	1.0	0.7	0.4
Estrona	7.0	5.0	0.2
Estradiol	1.7	1.5	0.7
Androstendiona residual	80.4 ± 11.3	85.5 ± 9.0	91.2 ± 1.6

*Células de la teca externa de folículos preovulatorios de diferentes tamaños: F5 (diámetro 11-15mm), F3 (diámetro 23-27mm), y F1 (diámetro 33-38mm).
 Tiempo de incubación: 15 minutos. n = 7
 Los valores representan la media.*

cuatro experimentos. Con androstendiona como precursor se detectó principalmente estrona con porcentajes de transformación de 0.2%, 5% y 7% para las células de F1, F3 y F5, respectivamente; se encontraron pequeñas cantidades de 17 β -estradiol con porcentajes de transformación de 0.7% para F1, 1.5% para F3 y 1.7% para F5. También se observó poca transformación a testosterona: 0.4% para F1, 0.7% para F3 y 1.0% para F5.

Para el análisis estadístico de los resultados de los cuatro experimentos se homogenizaron todos los datos (multiplicando cada uno por 100 y obteniendo su logaritmo en base 10), ya que las desviaciones estándar de los datos no homogenizados fueron muy grandes. Se obtuvieron las medias, utilizando los datos homogenizados y se compararon. De este modo se encontró diferencia significativa en el metabolismo de androstendiona entre las células de los diferentes folículos (tabla 4).

Recristalización de los productos del metabolismo de progestinas

Las recristalizaciones se realizaron utilizando los siguientes estándares: 17 α -hidroxipregnenolona, 17 α -hidroxiprogesterona, 20 β -dihidroprogesterona y 5-pregnen-3 β ,20 β -diol, 20 α -dihidroprogesterona, 5 α -pregnan-3 β ,20 β -diol, 5 β -pregnan-3 β ,20 β -diol. Como en los resultados de las cristalizaciones sucesivas de algunos estándares, la actividad específica fue muy baja desde las primeras recristalizaciones, sólo se presentan los datos de los cuatro primeros estándares, donde la actividad específica fue alta (ver tabla 5). Con base en estos resultados se encontró que el principal producto a partir de

progesterona fue 20 β -dihidroprogesterona y que a partir de pregnenolona fue 5-pregnen-3 β ,20 β -diol.

TABLA 5.
RECRISTALIZACION DE LOS PRODUCTOS DEL METABOLISMO DE PREGNENOLONA Y PROGESTERONA

SUSTRATO/ metabolito	Actividad específica cpm/mg				
	C1	C2	C3	C4	C5
PREGNENOLONA					
Pregnendiol	3124.9	2955.9	2589.7	2373.7	-
17 α -hidroxi- pregnenolona	2398.0	1381.0	863.4	439.8	-
PROGESTERONA					
20 β -DHP	4518.4	4082.6	3833.5	3358.1	3601.3
17 α -hidroxi- progesterona	3635.8	1928.3	1421.2	1274.4	1051.8

C1-C5 = cristalizaciones sucesivas.

Se utilizó el folículo F5 y aproximadamente 20 mg de cada estándar.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se puede afirmar que el folículo preovulatorio de la gallina resultó ser un modelo apropiado para el estudio del metabolismo de esteroides en las las células de la teca externa. Debido a su jerarquía característica y a su gran tamaño, se puede definir fácilmente el estado de maduración folicular, y por otra parte, su estructura anatómica permite la separación de manera sencilla de los estratos celulares.

Para evaluar la actividad esteroidogénica del tejido tecal íntegro se ha logrado obtener células de la teca, prácticamente libres de células de la granulosa (Zakar y Hertelendy, 1980; Tilly y Johnson, 1989). En tanto que la separación entre teca interna y teca externa ha sido más complicada debido a la relación morfológica que existe entre ellas, por lo que se ha requerido de un tratamiento enzimático y mecánico. Este método se ha aplicado en folículos de bovino (Roberts y Skinner, 1990), de equino (Siroist y cols., 1991) y de ave (Porter y cols., 1989; Nitta y cols., 1991). En el presente estudio la teca externa se purificó siguiendo la metodología descrita para aves.

El aspecto morfológico de las suspensiones celulares obtenidas del tejido tecal y la producción de esteroides son criterios que se han utilizado para diferenciar a las células de la teca interna de las de la teca externa (Porter y cols., 1989; Nitta y cols., 1991). En el presente trabajo se pudieron obtener las células de la teca externa con una pureza mayor del 90%, según el criterio morfológico. El tratamiento con tripsina permitió conseguir la

disgregación total de la teca externa sin afectar su viabilidad, su actividad esteroideogénica, ni su capacidad para responder al estímulo con gonadotropinas, estos resultados son similares a los descritos por otros autores (Porter y cols., 1989; Velázquez, y cols. 1991).

En el ovario de embriones de pollo la hCG estimula la producción de hormonas esteroideas, aumentando la secreción de testosterona y estradiol (Teng y Teng, 1977, 1979; Pedernera y cols., 1988); mientras que en tejido tecal de porcino (Toneta y cols., 1986) y de ave (Velázquez y cols., 1991) y en el tejido tecal intersticial de la rata (Simone y Mahesh, 1993) estimula la producción de estradiol. La hCG actúa vía AMPc (Teng y Teng, 1979) y el uso de MIX aumenta la respuesta a la estimulación por gonadotropinas (Teng y Teng, 1979; Pedernera y cols., 1988; Velázquez y cols., 1991), ya que MIX es un inhibidor de la fosfodiesterasa, enzima que hidroliza al AMPc. En nuestro modelo, la adición de hCG y MIX al medio de incubación tuvo por objeto colocar a las células en una situación de máxima estimulación para la síntesis de esteroideas.

El uso de precursores radiactivos y técnicas cromatográficas ha permitido identificar las rutas metabólicas presentes en diferentes tejidos esteroideogénicos (Nakamura y cols., 1974; Haffen y Cedard, 1968; Llewelyn, 1981; González y cols., 1983; Imataka y cols. 1989; Wiebbe y cols., 1990; McNatt y cols., 1992). El uso de esta metodología nos permitió caracterizar las capacidades esteroideogénicas de la teca externa, mediante la incubación de ésta con diferentes precursores de hormonas esteroideas, durante un tiempo muy corto, para identificar el o los productos inmediatos. De esta manera, se pudo deducir la presencia de

varias actividades enzimáticas.

En homogenados de la teca completa de folículos preovulatorios de gallina se presenta actividad de P450_{c17} (Lewelyn, 1981; Marrone y Hertelendy, 1985a). En este estudio, en la teca externa no se pudo detectar la presencia de las actividades enzimáticas del complejo P450_{c17}, ya que cuando se incubaron las células de la teca externa con pregnenolona o progesterona no se detectaron los metabolitos 17 α hidroxilados, productos de la primera reacción, ni tampoco se detectaron DHEA ni androstendiona, que son productos de la segunda reacción. La producción de los compuestos 17 α -hidroxilados se descartó por recristalización. Este hecho, sumado a que P450_{c17} sí se encontró en la teca interna (Gómez y cols., 1993), nos permite afirmar que este complejo enzimático no es activo en la células de la teca externa. Nuestros resultados difieren con lo informado por Nitta y cols. (1991) quienes muestran, en estudios de inmunoreactividad usando el antisuero para P450_{c17}, reacción positiva en las células de la teca externa de folículos preovulatorios de la misma especie. Sin embargo, en sus estudios no se comprobó esta actividad ni se detectó la producción de testosterona ni de androstendiona por las células de dicha capa. Por lo tanto, la inmunoreactividad observada por los investigadores antes mencionados podría ser explicada por la reacción cruzada o inespecífica del antisuero. Alternativamente, si el complejo P450_{c17}, está presente en las células de la teca externa, posiblemente existan factores en estas células que inhiban su actividad.

En este estudio, se detectó la presencia de 3 β -HSD en las células de la teca externa

cuando se utilizó DHEA como precursor, mostrando gran actividad pues a pesar del poco tiempo de incubación se detectó una alta transformación hacia androstendiona (28%). Cuando se utilizó pregnenolona como sustrato de la 3β -HSD se observó muy poca transformación a progesterona (2%). Al parecer la 3β -HSD detectada en la teca externa reconoce con diferente afinidad a pregnenolona y DHEA, siendo este último el sustrato preferido para esta teca. La presencia de 3β -HSD ha sido detectada en la capa tecal completa (Marrone y Hertelendy, 1983a; Toneta y cols., 1987) y ha sido localizada por inmunocitoquímica tanto en las células esteroideogénicas típicas de la teca interna como en islotes de células intersticiales que se observan fuera de la teca externa de folículos pequeños, pero no se detectó en las células de la teca externa de folículos preovulatorios (Nitta y cols., 1993). La posibilidad de contaminación en las células de la teca externa, obtenidas para este estudio, por células de la teca interna se descartó con base en estudios previos. La presencia de 3β -HSD fue detectada en las células de la teca interna, incubadas en las mismas condiciones que las células de la teca externa y utilizando también los mismos precursores. presentan un mayor porcentaje de transformación, aproximadamente dos veces comparado con el encontrado en teca externa (Gómez y cols., 1993). Estos resultados indican la posibilidad de que existan isoenzimas de la 3β -HSD en el tejido tecal, las cuales pueden ser estructuralmente diferentes y presentar diferente afinidad por sustrato (Labrie y cols., 1992). La existencia de isoenzimas de la 3β -HSD ha sido demostrada en roedores y en humanos humanos (Labrie y cols. 1992), pero no se ha descrito en aves. La presencia de isoenzimas permitiría regular la función esteroideogénica entre las tecas de manera diferente. Por lo que, para confirmar esta hipótesis se requieren más estudios.

El uso de dos sistemas de disolventes y cristalizaciones sucesivas nos permitió deducir la presencia de una 20β -reductasa en las células de la teca externa, la cual reconoce a la pregnenolona y progesterona como sustratos. Estos resultados confirman los previamente publicados por otros, quienes utilizando progesterona como precursor han detectado actividad de 20β -reductasa en ovario de embrión de pollo (Galli y Wassermann, 1972), en células de la granulosa (Wiebe y cols, 1990) y en la teca folicular completa (Llewelyn, 1981a). En este estudio se identificaron 20β -DHP (20β -dihidro-4-pregnen-3-ona) y pregnandirol (5 -pregnen- $3\beta,20\beta$ -diol), como productos de progesterona y pregnenolona, respectivamente. Estos resultados confirman lo observado en otros estudios en células de la teca completa de folículos preovulatorios, donde se han identificado 20β -DHP (20β -dihidro-4-pregnen-3-ona) y pequeñas cantidades de $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona a partir de progesterona (Marrone y Hertelendy, 1985). No obstante, utilizando la pregnenolona como precursor en células tecales, se identificaron como metabolitos a la androstendiona, la progesterona y pequeñas cantidades de progestinas 17α -hidroxiladas (Marrone y Hertelendy, 1983a; Nakamura y cols., 1974), pero no hay informes en los cuales se identifique el pregnandirol. Por lo tanto, este es el primer reporte que indica que la actividad de la 20β -reductasa se localiza en las células de la teca externa.

La presencia de esta actividad enzimática se podría explicar, por la existencia de enzimas polifuncionales, esto es, que una sola estructura proteica pueda tener dos o más actividades enzimáticas. Nakajin y cols. (1992) demostraron que una 20α -HSD purificada de adrenales de cerdo, contenía actividad de 3α -HSD, y que su función dependía del

sustrato, de tal modo que cuando éste era un $5\alpha/\beta$ -reducido la enzima mostró actividad de 3α -óxido reductasa e inhibió competitivamente la actividad de 20α -HSD. Otros estudios han mostrado la existencia de otras enzimas polifuncionales como la $3\beta,20\alpha$ -HSD en eritrocitos de bovino (Nancarrow y cols., 1981) y actividad de 17β -HSD en una enzima 3β -HSD expresada a partir de insertos de cDNA correspondientes a varias clonas de 3β -HSD de rata (de Launoit y cols., 1992). Sin embargo, para determinar si la actividad de 20β -reductasa corresponde a una enzima polifuncional es necesario purificar la proteína que contenga dicha actividad y realizar estudios de cinética enzimática con diversos sustratos. La posibilidad de que los eritrocitos participen con la actividad de 20β -reductasa en este modelo es mínima, ya que por un lado la presencia de eritrocitos en las células obtenidas de la teca externa fue escasa y por otro lado, las células de la teca interna no presentan esta actividad a pesar de ser ricamente vascularizadas.

Por otra parte, se ha informado que la teca externa de guajolote es capaz de producir andrógenos (utilizando suero antitestosterona para RIA, que cruza 33% con androstendiona), 10 veces menos de lo encontrado en teca interna (Porter y cols., 1991), pero no hay reportes sobre la actividad de 17β -HSD en dicha capa. Sin embargo, en un estudio inmunocitoquímico, Yoshinaga-Hirabayashi y cols. (1987) detectaron reacción positiva a la 17β -HSD en células tipo fibroblasto de la teca de ovario maduro de rata. Estas células son morfológicamente semejantes a las observadas en la teca externa. En nuestro estudio, al utilizar testosterona como sustrato se detectó alta actividad de 17β -HSD pues se observó gran transformación hacia androstendiona (50%), esta actividad es cinco veces mayor a la

encontrada en las células de la teca interna. Mientras que cuando se utilizó androstendiona como sustrato, apenas se pudo detectar su transformación a testosterona(1%). Cuando se usó DHEA como sustrato no se detectó actividad de 17β -HSD, pues no se pudo observar transformación a androst-5-ene- $3\beta,17\beta$ -diol. No se utilizaron estrona ni estradiol para buscar actividad de 17β -HSD con estrógenos. La presencia de actividad oxidante de la 17β -HSD permite proponer que la teca externa colabora con la teca interna modulando la producción de testosterona dado sus efectos androgénicos.

Midiendo metabolitos por radioinmunoanálisis se ha descrito que la teca externa puede producir estrógenos pero no así la teca interna (Nitta y cols., 1991; Porter y cols., 1991) y se ha detectado por inmunocitoquímica, la presencia de $P450_{aro}$ únicamente en grupos de células de la teca externa (Nitta y cols., 1991). Estos grupos celulares aromatasa positivos corresponden a los islotes de células epiteliales poco diferenciadas que se describen en la periferia de la teca externa (Velázquez y cols., 1991). En este estudio se pudo detectar la presencia de $P450_{aro}$ en la teca externa cuando se utilizó androstendiona como sustrato. Las variaciones en los porcentajes de transformación de androstendiona a estrona y 17β -estradiol observadas entre los experimentos, dificulta establecer diferencias en el grado de actividad de la aromatasa durante el desarrollo folicular, particularmente entre las células de los folículos F5 y F3. Sin embargo, la producción de estrona por las células de la teca del folículo F1 fue significativamente menor (<0.5%), lo cual coincide con la ausencia de las células epiteliales poco diferenciadas y confirma la ausencia de la actividad de aromatasa antes encontrada (Nitta y cols., 1991; Velázquez y cols., 1991). Las diferencias entre los

distintos experimentos se desconocen, pero pueden deberse a cambios en el lote de gallinas utilizadas, entre otros.

Cuando se utilizó testosterona como sustrato apenas se detectó su transformación a estradiol (2%), y su transformación a estrona en cantidad semejante a la de estradiol, lo cual puede explicarse por el hecho de que la testosterona es el sustrato que utiliza preferentemente la 17β -HSD, produciendo androstendiona que posteriormente se transforma en estrona por acción de la P450_{aro}. Este hecho, aunado que la producción de estrona fue significativamente mayor que la de estradiol en las células de la teca de todos los folículos preovulatorios, muestra que en estas células el estrógeno que se produce preferentemente es estrona.

Cuando el precursor utilizado fue DHEA, también se detectó la actividad de P450_{aro}. La androstendiona producida por la actividad de la 3β -HSD sobre la DHEA, puede ser utilizada como sustrato de la aromatasa y producir entonces estrona (1%).

Según nuestros datos, para la síntesis de estrógenos la teca externa de folículos de ave utiliza androstendiona de forma preferente a otros andrógenos. Por lo tanto, es de esperarse que la androstendiona se transforme en estrona y que posteriormente esta última se transforme en estradiol, ya que éste es un estrógeno más activo. Para probar esta hipótesis se tendría que estudiar el metabolismo de la teca externa a partir de E1 y E2. De cualquier modo, se ha informado que en el ovario fetal de bovino (Juárez-Oropeza y cols.,

1993), en el ovario en cultivo de embrión de rata (Weniger y cols., 1984) y en el ovario de pollo recién nacido (Alvarez-Fernández y cols., 1995) se produce más estrona que estradiol, siendo estos datos concordantes con nuestros hallazgos.

Los resultados de este estudio muestran que las células de la teca externa de folículos preovulatorios de gallina pueden utilizar pregnenolona y progesterona para producir otras progestinas como son las 20β -reducidas, pero no para sintetizar andrógenos. Esto apoya la teoría multicelular sobre la síntesis de esteroides en folículos ováricos de aves, que menciona que la teca externa sintetiza estrógenos utilizando principalmente los andrógenos producidos por la teca interna, pues la teca externa no los sintetiza. Además se ha mostrado que la androstendiona es preferentemente utilizada en la síntesis de estrógenos por el ovario fetal de bovino (Juárez-Oropeza y cols., 1993) y por el ovario de pollo recién nacido (Alvarez-Fernández y cols., 1995) lo que permite suponer que la teca externa puede utilizar preferentemente androstendiona en la síntesis de estrógenos. Por otra parte, el hecho de que la testosterona es rápidamente transformada a androstendiona por la 17β -HSD de la teca externa, apoya la hipótesis anterior. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el estado redox presente en nuestras condiciones de cultivo, afecte el sentido de la reacción en la que participa la 17β -HSD, en condiciones fisiológicas.

En este estudio se observa que las enzimas presentes en la teca externa son más activas en los folículos inmaduros F5 y F3 que en el folículo próximo a ovular. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las células obtenidas de F5 y F3, salvo en la actividad

de 20β -reductasa a partir de P_4 . Estos resultados apoyan los hallazgos de Porter y cols. (1897) y de Nitta y cols. (1991) que indican que la actividad esteroideogénica de la teca externa disminuye a medida que avanza la maduración folicular.

En el folículo maduro, la teca externa presenta muy poca actividad sintética de andrógenos, pero se producen otros metabolitos derivados de progesterona hidroxilados en las posiciones 17α , 20α , 20β (Hayano y cols., 1954 en: Marrone y cols., 1985) cuyo significado metabólico se desconoce. En los peces, los metabolitos 20β -reducidos participan en la regulación de la ruptura de la vesícula germinal (Duffey y Goets, 1980). En nuestros experimentos observamos que la reducción en la posición 20β es elevada y se mantiene constante durante la maduración folicular, lo que podría explicar la ausencia de actividad de $P450_{c17}$ en las células de la teca externa. De esta manera, los metabolitos 20β -reducidos podrían tener un papel importante en la maduración del ovocito, como lo especulan Marrone y cols. (1985). Alternativamente, si los metabolitos 20β -reducidos carecen de efectos biológicos estarían disminuyendo la disponibilidad de las progestinas biológicamente activas.

El control de la esteroideogénesis folicular implica diversos mecanismos de regulación parácrina en los cuales los productos de la esteroideogénesis regulan su propia producción o la de su precursor, modulando la actividad de alguna enzima clave. Mecanismos de regulación intraovárica de este tipo han sido demostrados en el pollo (Johnson y cols. 1987) la rata (Leung y Armstrong, 1979) y el cerdo (Hunter y Armstrong, 1987).

Por ejemplo, se describe que la actividad de la enzima 3β -HSD puede ser modulada por cambios en la concentración de andrógenos o estrógenos (Toneta y cols., 1987; Lee y Bahr, 1990), regulando de esta manera la síntesis de su precursor (progesterona) a partir de pregnenolona. Por otro lado, se ha descrito que la testosterona regula su propia producción, disminuyendo la síntesis de novo de las proteínas del complejo $P450_{c17}$ (Hales y cols., 1987).

El hecho de que nuestros resultados muestren la falta de actividad del complejo $P450_{c17}$ en la teca externa de los folículos preovulatorios, en cualquier estado de madurez, así como la disminución de la actividad de 3β -HSD a medida que el folículo madura, podría plantear la posibilidad de que los andrógenos y estrógenos producidos por la teca (interna y externa, respectivamente) regulen su propia producción. Por otra parte, la disminución de dichas actividades durante la maduración folicular, podría explicar la pérdida del efecto inhibitorio que los andrógenos y estrógenos ejercen sobre la producción de progesterona folicular (Jonsson y cols., 1987; Lee y Bahr, 1990; Smyth y cols., 1993) (ver figura 7). Según lo expuesto, podemos considerar que las enzimas 3β -HSD y el citocromo $P450_{c17}$ desempeñan un papel importante en la regulación de la esteroidogénesis tecal.

En conclusión, con base en los resultados del metabolismo de esteroides, se puede proponer que las células de la teca externa de folículos preovulatorios presentan las siguientes actividades enzimáticas: 1) 20β -reductasa (a partir de progestinas); 2) 3β -HSD (a partir de DHEA); 3) 17β -HSD (a partir de testosterona); 4) $P450_{aro}$ (a partir de

androstendiona y testosterona). Además, la actividad de estas enzimas disminuye a medida que avanza el desarrollo folicular, excepto para la 20β -reductasa que se mantiene. Por otro lado, al estudiar la actividad metabólica de la teca interna, se observó que las células de esta capa presentaron actividad de $P450_{c17}$ y de 5β -reductasa (Gómez y cols. 1993), pero no de aromatasa. El hecho anterior aunado al de no haber encontrado en la teca externa actividad de $P450_{c17}$ ni de 5β -reductasa, indica diferencias en las capacidades esteroideogénicas entre la teca interna y la teca externa.

Los datos anteriores validan la hipótesis de que la teca externa funciona como un compartimento esteroideogénico independiente, capaz de interactuar con las células de la teca interna y de la granulosa en la regulación de la esteroideogénesis folicular.

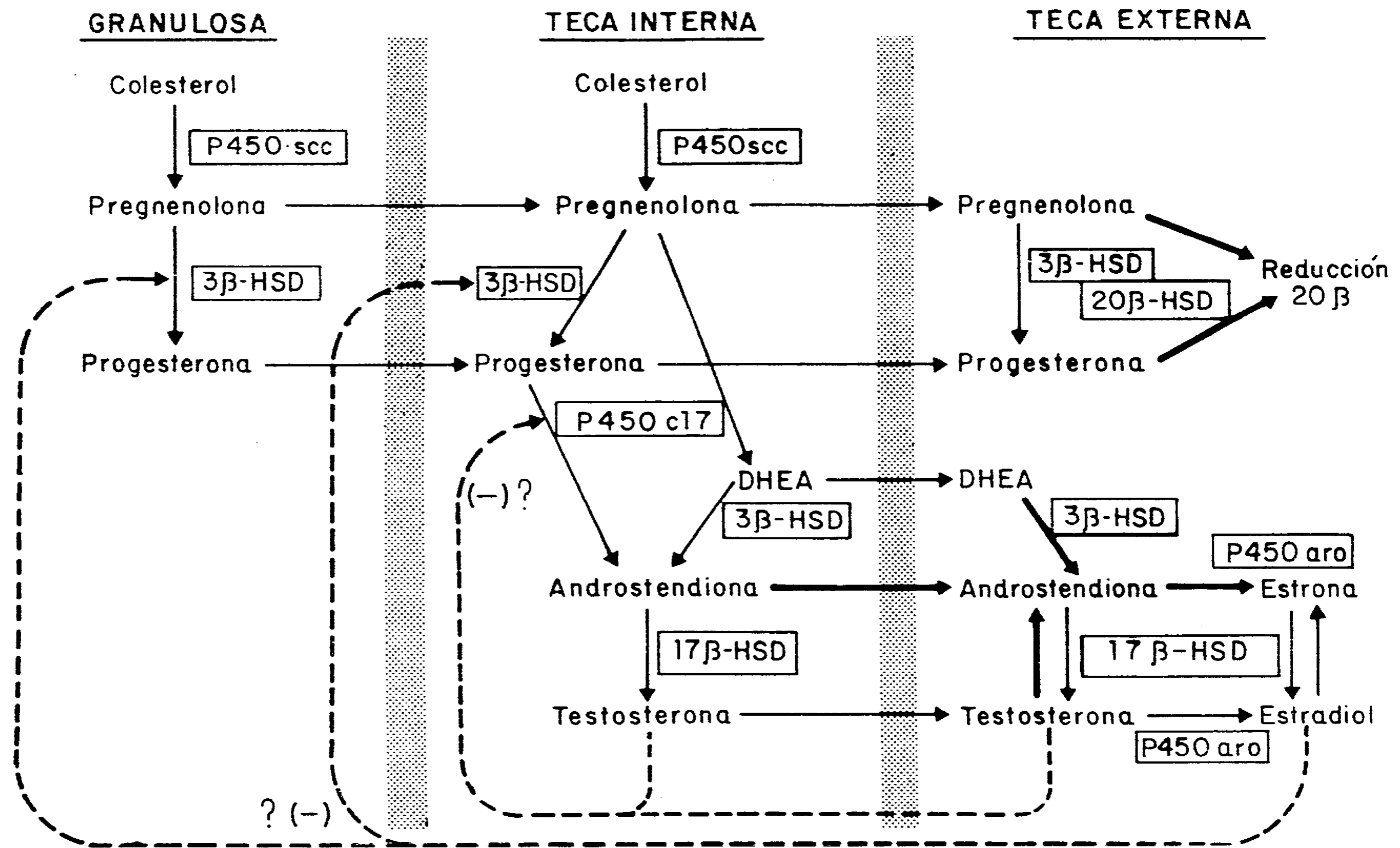


Figura 7. Modelo propuesto de la interacción entre las células de la granulosa, la teca interna y la teca externa para la síntesis de esteroides ováricos. Las flechas gruesas indican las rutas metabólicas de la teca externa, según los resultados del presente estudio. Las líneas punteadas muestran la probable participación de la teca externa en la regulación de la esteroidogénesis durante la maduración folicular.

BIBLIOGRAFIA

1. Alvarez-Fernández, G. Juárez-Oropeza, M.A., Velázquez, P., González del Pliego, M., Méndez-Herrera, M.C. & Pedernera, E. (1995). Newly hatched chick ovarian cell subpopulations metabolize distinctively progestin and androgen precursors. *Gen Comp Endocrinol* 97: 31-41.
2. Anderson, E. (1989). In vitro and in vivo effects of androgens on rat ovarian granulosa cells. *Am J Obstret gynecol* 160: 782-788.
3. Asem, E.K., Simpson, D.J. & Marrone, B.L. (1992). Hormone stimulated steroid biosynthesis in granulosa cells studied with a fluorogenic probe for cytochrome P-450_{cc}. *J Steroid Biochem Molec Biol* 43: 479-487.
4. Bahr, J.M., Wang, S.C., Huang, M.Y. & Calvo, F.O. (1983). Steroid concentrations in isolated theca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen. *Biol Reprod* 29: 326-334.
5. Calvo, F.O. & Bahr, J.M. (1983). Adenylyl cyclase system of the small preovulatory follicles of the domestic hen: responsiveness to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Biol Reprod* 29: 542-547.
6. Dahl, E. (1970) Studies of the fine structure of ovarian interstitial tissue. 2. The ultrastructure of the thecal gland of the domestic fowl. *Z. Zellforsch* 109: 195-211.
7. Díaz-Zagoya, J.C. y Hicks, J.J. (1988). Bioquímica e Inmunología. Vol. I Cap. 23 y Vol. II Cap. 5 y 6. Ed. Piensa, UNAM. México.
8. Duffey, R.J. & Goetz, F.W. (1980). The *in vitro* effects of 17 α -hidroxy-20 β -dihydroprogesterone on germinal vesicle breakdown in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) oocytes. *Gen Comp endocrinol* 41: 563-565.
9. Etches, R.J. & Cunningham, F.J. (1976). The interrelationship between progesterone and luteinizing hormone during the ovulation cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *J Endocrinol* 71: 51-58.
10. Etches, R.J. & Cheng K.W. (1981). Changes in the plasma concentrations of luteinizing hormone, progesterone, oestradiol and testosterone and in the binding of follicle-stimulating hormone to the theca of follicles during the ovulation cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *J Endocrinol* 91: 11-22.
11. Etches, R.J. & Duke, C.E. (1984). Progesterone, androstenedione and oestradiol content of theca and granulosa tissues of the four largest ovarian follicles during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *J Endocrinol* 103: 71-76.
12. Etches, R.J. & Petite, J.N. (1990). Reptilian and avian follicular hierarchies: models for the study of ovarian development. *J Exp Zool (Suppl)* 4: 112-122.
13. Galli, F. & Wassermann, G.F. (1972). Steroid biosynthesis by testes and ovaries of 15-day-old chick embryos. *Gen Comp Endocrinol* 19: 509-514.

14. Gilbert, A.B., Evans, A.J., Perry, M.M. & Davidson, M.H. (1977). A method for separating the granulosa cells, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (Gallus domesticus). *J Reprod Fert* 50: 178-181.
15. Gómez, Y., Pedernera, E., Juárez-Oropeza, M.A. y Velázquez, P.N. (1993). Metabolismo de andrógenos por la teca interna de folículos preovulatorios de aves (Gallus domesticus). XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Universidad Americana de Acapulco. Acapulco, Gro. del 15 al 20 de Agosto.
16. González, C.B., Cozza, E.N., De Bedners, M.E.O., Lantos, C.P. & Aragonéz A. (1983). Progesterone and its reductive metabolism in steroidogenic tissues of the developing hen embryo. *Gen Comp Endocrinol* 51: 384-393.
17. Guraya, S.S. (1959). Histochemical studies of lipids in oocytes. IV. Lipids in oogenesis of Gallus domesticus, Streptopelia senegalensis and Streptopelia decaocto. *Res Bull Panjab Univ* 10: 119-130.
18. Guraya, S.S. (1976). Correlative cytological and histochemical studies on the avian oogenesis. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch. Leipzig* 90: 91-150.
19. Haffen, K. & Cedard, L. (1968). Etude en organotypique in vitro du métabolisme de la déhydroépiandrostérone et de la testostérone radiactives, par les gonades normales et intersexuées de l'embryon de Poulet. *Gen Comp Endocrinol* 11: 220-234.
20. Hales, D.B., Sha, L. & Payne, A.H. (1987). Testosterone inhibits cAMP-induced de novo synthesis of Leydig cell cytochrome P-450_{17 α H} by an androgen receptor-mediated mechanism. *J Biol Chem* 262: 11200-11206.
21. Hammond, R.W., Burke, W.H. & Hertelendy, F. (1981). Influence of follicular maturation on progesterone release in chicken granulosa cells in response to turkey and ovine gonadotropins. *Biol Reprod* 24: 1048-1055.
22. Hanukoglu, I. (1992). Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Molec Biol* 43: 779-804.
23. Hanukoglu, I., Gutfinger, T., Haniu, M. & Shively, J.E. (1987). Isolation of a cDNA for adrenodoxin reductase (ferredoxin-NADP⁺ reductase). Implications for mitochondrial cytochrome P-450 systems. *Eur J Biochem* 169: 449-455.
24. Hedin, L., Rodgers, R.J., Simpson, E.R. & Richards J.S. (1987). Changes in content of cytochrome P450_{17 α} , cytochrome P450_{sc}, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in developing rat ovarian follicles and corpora lutea: correlation with theca cells steroidogenesis. *Biol Reprod* 37: 211-223.
25. Hernández-Vértiz, A., González del Pliego, M., Velázquez, P. y Pedernera, E. (1993). Morphological changes in the thecal layer during the maturation of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (Gallus domesticus). *Gen Comp Endocrinol.* 92: 80-87.
26. Hillier, S.G. (1991). Intraovarian steroid action. En: *The new biology of steroids hormones*. R.B. Hochberg, F. Naftolin Editores. Serono Symposia Publications, Raven Press, New York. Vol. 74 pp. 227-234.
27. Hodges, R.D. (1974). *The histology of the fowl*. Academic Press. London. pp. 326-347.

28. Hsueh, A.J.W., Adashi, E.Y., Jones, P.B.C. & Wells, T.H. (1984). Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr. Rev.* **5**: 76-127.
29. Huang, E.S. & Nalbandov, A.V. (1979). Steroidogenesis of sex chicken granulosa and theca cells: in vitro incubation system *Biol Reprod* **20**: 454-461.
30. Hughes, G.C. (1963). The population of germ cells in the developing female chick. *J Embryol Exp Morph* **11**(3): 513-536.
31. Hunter, M.G. & Armstrong, D.T. (1987). Oestrogens inhibit steroid production by dispersed porcine thecal cells. *Mol Cell Endocrinol* **50**: 165-170.
32. Imataka, H., Suzuki, K., Inano, H., Kohmoto, K. & Tamaoki, B.I. (1989). Biosynthetic pathways of testosterone and estradiol-17 β in slices of the embryonic ovary and testis of the chicken (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol* **73**: 69-79.
33. Johnson, P.A., Stoklosowa, S. & Bahr, J.M. (1987). Interaction of granulosa and theca layers in the control of progesterone secretion in the domestic hen. *Biol Reprod* **37**: 1149-1155.
34. Johnson, A.L. & van Tienhoven, A. (1980). Plasma concentrations of six steroids and LH during the ovulatory cycle of the hen, *Gallus domesticus*. *Biol. Reprod.* **23**: 386-393.
35. Johnson, A.L. (1993). Regulation of follicle differentiation by gonadotropins and growth factors. *Poult Sci* **72**: 867-873.
36. Johnson, A.L. (1994). Regulation of hen granulosa cell differentiation and steroid production. *Assisted reproductive technology andrology VI (issues 1,2)*: 129-142.
37. Juárez-Oropeza, M.A., Alvarez-Fernández, G., López, V., Kawa, S. & Pedernera E. (1993). Steroid metabolism in the cortex and the medulla of early fetal bovine ovary. *J Exp Zool* **266**: 102-107.
38. Kato, M., Shimada, K., Saito N., Noda, K. & Ohta, M. (1995). Expression of P450_{17 α hydroxylase} and P450_{aromatase} genes in isolated granulosa, theca interna, and theca externa layers of chicken ovarian follicles during follicular growth. *Biol Reprod* **52**: 405-410.
39. Kikuchi, M. & Ishii, S. (1992). Changes in luteinizing hormone receptors in the granulosa and theca layers of the ovarian follicle during follicular maturation in the Japanese quail. *Gen Comp Endocrinol* **85**: 124-137.
40. Knobil, E. & Neil, J.D. editores (1988). The physiology of Reproduction. Vol. I Cap. 8 y 10. Raven Press, New York.
41. Kotsuji F., Kamitani, N., Goto, K. & Tominaga, T. (1990). Bovine theca and granulosa cells interactions modulate their growth, morphology, and function. *Biol Reprod* **43**: 726-732.
42. Kowalski K.I., Tilly, J.L. & Johnson, A.L. (1991). Cytochrome P450 side-chain cleavage (P450_{scc}) in the hen ovary. I. Regulation of P450 _{scc} messenger levels and steroidogenesis in theca cells of developmental follicles. *Biol Reprod* **45**: 955-966.
43. Labrie, F., Simard, J., Luu-The, V., Bélanger, A. & Pelletier, G. (1992). Structure, function and tissue-specific gene expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase enzymes in classical and peripheral intracrine steroidogenic tissues. *J Steroid Biochem Molec Biol* **43**: 805-826.

44. Launoit de, Y., Simard, J., Durocher, F. & Labrie, F. (1992). Androgenic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity of expressed rat type I 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase. *Endocrinology* 130: 553-555.
45. Lee, H.T. & Bahr, M.B. (1990). Inhibition of the activities of P450 cholesterol side-chain cleavage and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the amount of P450 cholesterol side-cleavage by testosterone and estradiol-17 β in hen granulosa cells. *Endocrinology* 126: 779-786.
46. Leung, P.C.K. & Armstrong, D.T. (1979). Estrogen treatment of immature rats inhibits ovarian androgen production in vitro. *Endocrinology* 104: 1411-1417.
47. Li, Z. & Johnson, A.L. (1993a). Expression and regulation of cytochrome P450 17 α -hydroxylase messenger ribonucleic acid levels and androstenedione production in hen granulosa cells. *Biol Reprod* 49: 1293-1302.
48. Li, Z. & Johnson, A.L. (1993). Regulation of P450 cholesterol side-chain cleavage messenger ribonucleic acid expression and progesterone production in hen granulosa cells. *Biol Reprod* 49: 463-469.
49. Llewelyn, C.A. (1981a). Conversion of progesterone to 20 β -hydroxy-4-pregnen-3-one by the preovulatory follicle in the hen (*Gallus domesticus*). *IRCS Med Sci* 9: 859.
50. Llewelyn, C.A. (1981). Conversion of [4-¹⁴C]Progesterone to androstenedione in vitro by thecal tissue from ovary of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J Endocrinol* 89: 283-288.
51. MacLaughlin, D.T., Hutson, J.M. & Donahoe, P.K. (1983). Specific estradiol binding in embryonic mullerian duct: A potential modulator of regression in the male and female chick. *Endocrinology* 113: 141-145.
52. Marrone, B.L. & Hertelendy, F. (1983). Steroid by avian ovarian cells: effects of luteinizing hormone and substrate availability. *Am J Physiol* 244: E487-E493.
53. Marrone, B.L. & Hertelendy, F. (1983a). Steroid metabolism by avian ovarian cells during follicular maturation. *Biol Reprod* 29: 953-962.
54. Marrone, B.L., Wiebe, J.P. Buckingham, K.D. & Hertelendy, F. (1985). Analysis of steroids metabolites produced by the theca cells from the adult domestic hen. *J Steroid Biochem* 23: 563-565.
55. Marrone, B.L. & Hertelendy, F. (1985a). Decreased androstenedione production with increased follicular maturation in theca cells from the domestic hen (*Gallus domesticus*). *J Reprod Fert* 74: 543-550.
56. McAllister, J.M., Mason, J.I., Byrd, W., Trant, J.M., Waterman, M.R. & Simpson, E.R. (1990). Proliferating human granulosa-lutein cells in long term monolayer culture: expression of aromatase, cholesterol side-chain cleavage, and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Clin Endocrinol Metab* 71:26-33.
57. McNatt, L.G., Lane, D. & Clark, A.F. (1992). Angiostatic activity and metabolism of cortisol in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chick embryo. *J Steroid Biochem Molec Biol* 42: 687-693.

58. Monsdchein, J.S., Canning, S.F. & Hammond J.M. (1988). Effects of transforming growth factor- β on the production of immunoreactive insulin-like growth factor I and progesterone and on [3 H]thymidine incorporation in porcine granulosa cell cultures. *Endocrinology* **123**: 1970-1976.
59. Mulheron, G.W., Wise, T.H., Stone, R.T. & Ford, J.J. (1990). Follicle-stimulating hormone regulation of cytochrome P-450 side-chain cleavage messenger ribonucleic acid accumulation by porcine granulosa cells isolated from small and medium follicles. *Biol Reprod* **43**: 828-834.
60. Nakajin, S., Fujii, S., Ohno, S. & Shinoda, M. (1992). 3α -hydroxysteroid dehydrogenase activity catalized by purified pig adrenal 20α -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Molec Biol* **41**: 179-184.
61. Nakamura, T., Tanabe, Y. & Katukawa, H. (1974). Steroidogenesis in vitro by ovarian tissue of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J Endocrinol* **63**: 507-516.
62. Nancarrow, C.D., Sharaf, M.A. & Sweet, F. (1981). Purification of 20α -hydroxysteroid oxydoreductase from bovine fetal erythrocytes. *Steroids* **37**: 539-553.
63. Nitta, H., Osawa, Y & Bahr, J.M. (1991). Multiple steroidogenic cell populations in the thecal layer of preovulatory follicles of the chicken ovary. *Endocrinology* **129**: 2033-2040.
64. Nitta, H., Mason, J.I. & Bahr, J.M. (1993). Localization of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in the chicken ovarian follicle shifts from the theca layer to granulosa layer with follicular maturation. *Biol Reprod* **48**: 110-116.
65. Pedernera, E., Gómez, Y., Velázquez, P. & Juárez-Oropeza, M.A. (1988). Identification of steroidogenic subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. *Gen Comp Endocrinol* **71**: 153-162.
66. Perry, M.M., Gilbert, A.B., Evans, A.J. (1978). Electron microscope observations on the ovarian follicle of the domestic fowl during the rapid growth phase. *J. Anat.* **125**: 481-497.
67. Porter, T.E., Hargis, B.M., Silsby, J.L. & el Halawani, M.E. (1989). Differential steroid production between theca interna and theca externa cells: a three-cell model for follicular steroidogenesis in avian species. *Endocrinology* **125**: 109-116.
68. Porter, T.E., Hargis, B.M., Silsby, J.L. & el Halawani, M.E. (1991). Characterization of dissimilar steroid productions by granulosa, theca interna and theca externa cells during follicular maturation in the turkey (*Meleagris gallopavo*). *Gen Comp Endocrinol* **84**: 1-8.
69. Roberts, A.J., Skinner, M.K. (1990). Estrogen regulation of thecal cell steroidogenesis and differentiation: thecal cell interactions. *Endocrinology* **127**: 2918-2929.
70. Roberts, A.J., Skinner, M.K. (1990a). Mesenchymal-epithelial cell interactions in the ovary: estrogen-induced theca cell steroidogenesis. *Molec. Cell. Endocrinol* **72**: R1-R5.
71. Rodgers, R.J., Waterman, M.R. & Simpson, E.R. (1986). Cytochromes P-450_{ccc}, P-450_{17 α} , adrenoxin and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase in bovine follicles and corpora lutea. Changes in specific contents during the ovarian cycle. *Endocrinology* **118**: 1366-1374.
72. Scheib, D. (1983). Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation* **23**(Suppl): 87-92.

73. Simone, D.A. & Mahesh, V.B. (1993). An autoregulatory process for androgen production in rat thecal-interstitial cells. *Biol Reprod* 48: 46-56.
74. Sirois, J., Kimmich, T.L. & Fortune J.E. (1991). Steroidogenesis by equine preovulatory follicles: relative roles of theca interna and granulosa cells. *Endocrinology* 128: 1159-1166.
75. Skinner, M.K. & Coffey, R.J. Jr (1988). Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor α by theca cells. *Endocrinology* 123: 2632-2638.
76. Smyth, C.D., Miró, F. Whitelaw, P.F. Howles, C.M. & Hillier, S.G. (1993). Ovarian thecal/interstitial androgen synthesis is enhanced by a follicle-stimulating hormone-stimulated paracrine mechanism. *Endocrinology* 133: 1532-1538.
77. Stone, D. & Hechter, O. (1954). *Arch. Biochem. Biophys.* 51: 457-469.
78. Sturkie, P.D. (1976). Avian Physiology. 3a. ed. Springer-Verlag, New York. Cap. 16 pp. 301-326.
79. Tanabe, Y., Noboru, S. & Nakamura, T. (1986). Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol.* 63: 456-463.
80. Tennant, J.R. (1964). Evaluation of the trypan blue technique for the determination of cell viability. *Transplantation* 2: 685-694.
81. Teng, C.T. & Teng C.S. (1977). The hormonal regulation of steroidogenesis and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in embryonic-chick ovary. *Biochem J* 162: 123-134.
82. Teng, C.T. & 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.
83. Tilly, J.L. & Johnson, A.L. (1989). Regulation of androstenedione production by adenosine 3',5'-monophosphate and phorbol myristate acetate in ovarian thecal cells of the domestic hen. *Endocrinology* 125: 1691-1699.
84. Tilly, J.L., Kowalski, K.I. & Johnson, A.L. (1991). Stage of ovarian follicular development associated with the initiation of steroidogenic competence in avian granulosa cells. *Biol Reprod* 44: 305-314.
85. Tilly, J.L., Kowalski, K.I., Li, Z., LeVorse, J.M. & Johnson, A.L. (1992). Plasminogen activator activity and thymidine incorporation in avian granulosa cells during follicular development and the periovulatory period. *Biol Reprod* 46: 195-200.
86. Toaff, M.E., Strauss, J.F. & Hammond, J.M. (1983). Regulation of cytochrome P-450_{cc} in immature porcine granulosa cells by FSH and estradiol. *Endocrinology* 112: 1156-1158.
87. Toneta, S.A., DeVinna, R.S. & diZerega, G.S. (1986). Modulation of porcine thecal cell aromatase activity by human chorionic gonadotropin, progesterone, estradiol-17 β , and dihydrotestosterone. *Biol Reprod* 35: 785-791.
88. Toneta, S.A., DeVinna, R.S. & diZerega, G.S. (1987). Thecal cell 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase activity: modulation by human chorionic gonadotropin, progesterone, estradiol-17 β , and dihydrotestosterone. *J Steroid Biochem* 28: 77-82.

89. Tuckey, R.C. & Atkinson, H.C. (1989). Pregnenolone synthesis from cholesterol and hydroxycholesterols by mitochondria from ovaries following the stimulation of immature rats with pregnant mare's serum gonadotropin and human choriogonadotropin. *Eur J Biochem* 186:255-259.
90. Unsicker, K. Seidel, F., Hofmann, H.D. Müller, T.H. Schmidt, R., & Wilson, R. (1983). Catecholaminergic innervation of the chicken ovary. With special reference to the follicular wall. *Cell Tissue Res* 230: 431-450.
91. Van Nassauw, L., Harrison F. & Callebaut, M. (1994). Contractile activity of ovarian follicles. *Assisted reproductive technology andrology VI* (issues 1,2): 113-127.
92. Velázquez, P., Gómez, Y., González del Pliego, M. y Pedernera, E. (1991). Steroidogenic cell subpopulations obtained from the theca of preovulatory follicles in the ovary of the domestic fowl. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83: 243-248.
93. Wang, X.N. & Greenwald, G.S. (1993). Synergistic effects of steroids with FSH on folliculogenesis, steroidogenesis and FSH- and hCG-receptors in hypophysectomized mice. *J Reprod Fert* 99: 403-413.
94. Welty, J.C. (1975). The life of the birds. 2nd Ed. W.B. Saunders Philadelphia Co. Edit. pp 137-147.
95. Wells, J.W. & Gilbert, A.B. (1984). Steroid hormone production by the ovary. En: *Physiology and Biochemistry of Domestic Fowl*, Vol. 5 Cap. 10. Academic Press, London.
96. Weniger, J.P., Chouraqui, J. & Zeis, A. (1984). Conversion of testosterone and progesterone to oestrone by the ovary of the rat embryo in organ culture. *J Steroid Biochem* 21: 347-349.
97. Wiebe, J.P., Buckingham, K.D., Zobel, R.L. & Hertelendy, F. (1990). Metabolism of progesterone by avian granulosa cells in culture. *J Steroid Biochem Molec Biol* 37: 113-120.
98. Yoshimura, Y. Bahr, J.M. (1991). Localization of progesterone receptors in pre- and postovulatory follicles of the domestic hen. *Endocrinology* 128: 323-330.
99. Yoshinaga-Hirabayashi, T. Ishimura, K. Fujita, H. Inano H. Ishii-Ohba, H. and Tamaoki, B. (1987). Immunocytochemical localization of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD), and its relation to the ultrastructure of steroidogenic cells in immature and mature rat ovaries. *Arch Hist Jap* 50(5): 545-556.
100. Zakar, T., Hertelendy, F. (1980). Effect of mammalian LH, cyclic AMP and phosphodiesterase inhibitors on steroidogenesis, lactato production, glucosa uptake and utilization by avian granulosa cells. *Biol Reprod* 22: 810

APENDICE

Nombres de los esteroides utilizados

Nombre Común	Nombre Sistemático
Pregnenolona	5-pregnen-3 β -ol-20-ona
Progesterona	4-pregnen-3,20-diona
17 α -hidroxipregnenolona	5-pregnen-3 β ,17 α -diol-20-ona
17 α -hidroxiprogesterona	4-pregnen-17 α -ol-3,20-diona
20 α -dihidroprogesterona	4-pregnen-20 α -ol-3-ona
20 β -dihidroprogesterona	4-pregnen-20 β -ol-3-ona
5 α -pregnanolona	5 α -pregnan-3 β -ol-20-ona
5 β -pregnanolona	5 β -pregnan-3 β -ol-20-ona
5 β -pregnandiona	5 β -pregnan-3,20-diona
5 β ,20 α -pregnandioli	5 β -pregnan-3 β ,20 α -dioli
5 β ,20 β -pregnandioli	5 β -pregnan-3 β ,20 β -dioli
20 α -pregnendioli	5-pregnen-3 β ,20 α -dioli
20 β -pregnendioli	5-pregnen-3 β ,20 β -dioli
Dehidroepiandrosterona	5-androsten-3 β -hidroxi-17-ona
Androstendiona	4-androsten-3,17-diona
Testosterona	4-androsten-17 β -ol-3-ona
Androstendioli	4-androsten-3 β ,17 β -dioli
Estrona	1,3,5,(10)-estratrien-3-ol-17-ona
Estradioli	1,3,5,(10)-estratrien-3,17 β -dioli
5 α -androstandiona	5 β -androstan-3,17-diona
5 β -androstandiona	5 α -androstan-3,17-diona

ANEXOS

1. Solución salina balanceada libre de Ca^{++} y Mg^{++}

NaCl	8.00 g	(J.T. Baker, México)
KH_2PO_4	0.20 g	(J.T. Baker, México)
KCl	0.20 g	(Química Dinámica, México)
Na_2HPO_4	1.15 g	(J.T. Baker, México)

Disolver y aforar con 1000 ml de agua destilada y ajustar el pH a 7.4 con bicarbonato de sodio..

2. Líquido de centelleo

PPO	4.0 g	(Sigma Chemical Co.,USA)
Dimetil-POPOP	0.2 g	(Sigma Chemical Co.,USA)
Tolueno	667 ml	(J.T. Baker, México)
Tritón X-100 333 ml		(Sigma Chemical Co.,USA)

