

00381

17
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFECTO DE LOS ESTROGENOS EN EL
DESARROLLO DEL OVARIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

BIOL. MARIA DEL CARMEN MENDEZ HERRERA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1996



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Este trabajo de tesis, se realizó en el Departamento de Embriología, de
la Facultad de Medicina, de la UNAM**

AGRADECIMIENTOS

Dra. Ma. Elena Castillo Romero

Jefa del Departamento de Embriología, por todo el apoyo que siempre me ha brindado.

Dr. Enrique Pedernera A.

Coordinador de Investigación del Departamento de Embriología, quien con su experiencia y sus conocimientos hizo posible la realización de esta tesis.

Por su amistad.

Dr. Gerardo H. Vázquez-Nin y a la Dra. Olga Echeverría, profesores de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por la asesoría brindada en el trabajo de microscopía electrónica.

M. en C. Bertha Chávez y el M. en C. Felipe Vilchis, investigadores del Departamento de Biología de la Reproducción, del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", por su valiosa colaboración en los estudios bioquímicos y en lo personal, por su ayuda siempre cálida e incondicional.

Dr. Gabriel Corkidi por su apoyo en el estudio morfométrico.

Sr. Tomás Cruz Méndez por el excelente trabajo fotográfico y sobre todo por la alegría de su amistad.

Sr. Rafael Enríquez por su apoyo en el dibujo de las gráficas.

A todo el personal del Departamento de Embriología.

A mis hijos:

A Paulina por su sensibilidad y cariño.

A Esteban por su amor y alegría.

Ambos llenan mi vida de felicidad y son el motivo de mi superación personal y académica.

A mi madre, por su amor y apoyo en todos los momentos de mi vida.

A la memoria de mi padre, Jorge Méndez Robles.

A mis hermanos: Jorge, Pedro, Antonio, Miguel, Genaro, Margarita, Blanca y Dolores, por ser eso; mis hermanos.

A mis amigos: Sandra, Silvia, Kristel, Charlene, Sofia, Martha, Gilberto, Pablo, Ricardo, Alberto y Fabio.

A los Honorables Miembros del Jurado:

Presidente : Dr. Gerardo Hebert Vazquez Nin.

Primer Vocal : Dra. Olga Margarita Echeverría.

Segundo Vocal : Dr. Enrique Antonio Pedernera A.

Tercer Vocal : M. en C. Héctor Antonio Ponce Monter.

Secretario : Marco Antonio Juárez Oropeza.

Suplente : Dr. Roberto Domínguez Casalá.

Suplente : Dra. Rebeca Chavez Genaro.

INDICE

I.- Resumen.....	1
II.- Introducción.....	4
II.1 Formación Inicial de la Gónada.....	5
II.2 Origen y Migración de las Células Germinales Primordiales.....	7
II.3 Diferenciación Gonadal.....	9
II.4 Desarrollo del Ovario de las Aves.....	14
II.5 Control Génico del Inicio de la Meiosis.....	18
II.6 Biosíntesis y Función de Estrógenos.....	19
II.7 Esteroides Gonadales Durante el desarrollo Embrionario de las Aves.....	22
II.8 Mecanismo de Acción de los Estrógenos.....	28
II.9 El Receptor de Estrógeno en las Aves.....	31
II.10 Localización del Receptor de Estrógenos en el Ovario de los Mamíferos.....	32
II.11 Presencia del Receptor de Estrógeno en el Ovario de Pollo.....	34
III. Planteamiento del Problema.....	36
IV. Objetivos.....	38
V. Materiales y Métodos	40
V.1 Cuanificación de las Subpoblaciones de Células Ováricas.....	41
V.2 Subfases de la Profase I de la Meiosis en los Ovocitos.....	42
V.3 Secreción de Hormonas Esteroides.....	43

V.4 Estudio Morfométrico.....	44
V.5 Captación Específica del 17 β -estradiol por Células Intactas del ovario.....	45
V.6 Caracterización del Complejo de Unión Hormona-Receptor.....	45
V.7 Especificidad de la Unión del 17 β -estradiol en Células del Ovario.....	47
V.8 Captación Específica del 17 β -estradiol en Subpoblaciones de Células Ováricas.....	47
V.9 Inmunolocalización del Receptor a Estrógenos por Microscopía Electrónica.....	49
V.10 Análisis Estadístico.....	51

VI. Resultados

VI.1 Cuanificación de las Subpoblaciones de Células Ováricas.....	52
VI.2 Subfases de la Profase I de la Meiosis en los Ovocitos.....	55
VI.3 Secreción de 17 β -estradiol.....	58
VI.4 Estudio Morfométrico.....	61
VI.5 Receptor a Estrógeno.....	64
VI.6 Unión del 17 β -estradiol en Subpoblaciones Purificadas de Células Ováricas.....	71
VI.7 Inmunolocalización del Receptor a Estrógenos por Microscopía Electrónica.....	75

VII. Discusión

VII.1 Cuanificación de Células Ováricas.....	82
--	----

VII.2 Subfases de la Meiosis	85
VII.3 Secreción de Hormonas Esteroides.....	86
VII.4 Estudio Morfométrico.....	89
VII.5 Receptor de Estrógeno.....	93
VIII Conclusiones y Perspectivas.....	98
IX Bibliografía.....	102

Efecto de los Estrógenos en el Desarrollo del Ovario

Las hormonas esteroides sexuales, andrógenos estrógenos y progestágenos, intervienen en la reproducción y el dimorfismo sexual. Es conocida la importancia de los andrógenos testiculares en la diferenciación del aparato genital masculino. Por otra parte, si bien los estrógenos gonadales y el receptor a estrógeno se encuentran presentes durante el desarrollo embrionario del ovario de mamíferos, no está clara cuál es la participación de estas hormonas en la organogénesis gonadal. En este trabajo se estudia la influencia del 17β -estradiol sobre las subpoblaciones celulares que integran el ovario del pollo (*Gallus domesticus*) durante su desarrollo embrionario y se obtienen evidencias de la presencia del receptor a estrógeno en las células ováricas. A los 13, 15, 17 y 21 días de incubación se cuantificó el número de células somáticas y germinales en el ovario del embrión de pollo testigo y tratado con 200 ng de 17β -estradiol a los 11, 13 y 15 días de desarrollo embrionario. Dentro de las subpoblaciones de células ováricas, el 17β -estradiol aumentó el número de células somáticas sin inclusiones de lípidos y no modificó el número de las células somáticas con abundantes inclusiones de lípidos ni el número de células germinales. El tratamiento con 17β -estradiol no modificó los estadios de la profase de la primera división meiótica ni el diámetro celular promedio de los ovocitos primarios. La secreción de 17β -estradiol al medio de cultivo, por las células ováricas estimuladas con gonadotropina coriónica humana durante incubaciones cortas, es mayor en los animales tratados con estrógeno. El número de ovocitos, de células pregranulosas y de células esteroidogénicas típicas en el pollo recién nacido testigo no difiere con los tratados con 17β -estradiol, pero sí el de las células epiteliales relativamente indiferenciadas de la médula ovárica, el cual está significativamente aumentado en el grupo tratado. El área celular promedio de los tipos celulares mencionados no se modificó por efecto del estrógeno, excepto para la células pregranulosas en las que el área celular está aumentada. En una suspensión celular mixta las células ováricas captan específicamente [^3H] 17β -estradiol, al igual que lo captan las subpoblaciones celulares de ovocitos, células esteroidogénicas típicas y células epiteliales relativamente indiferenciadas. La unión del esteroide radiomarcado se observa en la fracción nuclear y citosólica. La captación específica del esteroide sólo es desplazada por compuestos estrogénicos. El complejo hormona-receptor en las células ováricas, tiene un coeficiente de sedimentación de 7-8 S, lo que es característico del receptor a estrógeno. En los ovocitos primarios, las células pregranulosas, las células esteroidogénicas típicas y células epiteliales relativamente indiferenciadas de la médula, el receptor a estrógeno se inmunolocalizó a nivel ultraestructural con anticuerpos monoclonales y oro coloidal, predominando en los núcleos celulares y en relación con la cromatina extendida. Los resultados obtenidos permiten sugerir que el receptor a estrógeno se encuentra en todos los tipos celulares estudiados y que el efecto biológico del 17β -estradiol en etapa embrionaria

se observa en las células somáticas del ovario, principalmente en las células pregranulosas y células epiteliales relativamente indiferenciadas de la médula.

Effect of Estrogens on the Ovarian Development

Sex steroid hormones (androgens, estrogens and progestagens) are involved in reproduction and sexual dimorphism. The importance of testicular androgens is known for the differentiation of the male genital system. Gonadal estrogens and their receptors are present in the mammalian ovary during embryonic development. Nevertheless, the role of these hormones in the gonadal organogenesis is still unclear. This study focuses on the influence of 17β -estradiol on the cellular subpopulations of the chick (*Gallus domesticus*) ovary during its embryonic development, in addition to gathering evidence of existence of estrogen receptor proteins in ovarian cells. Somatic and germ cells were quantified for ovaries of treated (200ng of 17β -estradiol at days 11,13, and 15 of incubation) and control chick embryos at 13,15 17 and 21 days of development. Within the subpopulation of somatic cells, 17β -estradiol increased the number of the cells without lipid inclusions, but did not alter the number of cells with such inclusions. Furthermore, the population of germ cells remained unchanged. Treatment with 17β -estradiol does not modify the subphases of the first meiotic division of the primary oocyte nor their average diameter. Secretion of the 17β -estradiol into the culture medium by ovarian cells, incubated for short periods of time and stimulated with human chorionic gonadotropin hormone, is greater from the estrogen treated embryos. There is no difference in the number of oocytes, pregranulosa cells and typical steroidogenic cells between treated and untreated newly hatched chicks, however, the number of relatively undifferentiated epithelial cells is significantly increased in the group of treated animals. The average cellular area of the above mentioned cells groups, was unchanged by the effect of estrogens, with the exception of the pregranulosa cells, for which the total average area is augmented. Mixed ovarian cells in culture incorporated [3 H] 17β -estradiol, as well as in cultures of isolated oocytes, typical steroidogenic cells, pregranulosa cells and relatively undifferentiated epithelial cells. The specific [3 H] steroid binding is observed in both, the nuclear and cytosolic fractions, and is only removed by estrogenic compounds. The hormone-receptor complex in ovarian cells has a sedimentation coefficient with 7-8 S, which is characteristic of the steroid receptor. This receptor was immunolocalized, at the ultrastructural level with monoclonal antibodies and developed with gold, in primary oocytes, pregranulosa cells, typical steroidogenic cells and undifferentiated epithelial cells in the ovarian medulla. The receptor was found in greater quantities in the nuclei. With the data obtained we were able to conclude that the steroid receptor is found in all studied cell types and the biological effect of the 17β -estradiol is observed in embryonic somatic cells in the ovary, mainly on pregranulosa cells and relatively undifferentiated epithelial cells of the medullary region.

INTRODUCCION

La determinación del sexo en los seres vivos ha sido objeto de múltiples estudios. Actualmente, está bien demostrado que el sexo de los mamíferos se establece genéticamente y no se encuentra influido por el medio ambiente. En las aves la determinación del sexo también es genética, aunque experimentalmente se ha obtenido feminización testicular transitoria modificando el medio ambiente hormonal (Wolff y Haffen, 1952; Weniger, 1962; Samsel y col.1982); también se logra la reversión sexual definitiva bloqueando la producción de estrógenos con inhibidores del complejo enzimático aromatasa (Elbrecht y Smith, 1992). En los reptiles, el sexo de las serpientes y las lagartijas está determinado cromosómicamente, pero en la mayoría de las especies de tortugas y cocodrilos la temperatura a la que está sometido el huevo durante su incubación es el factor determinante del sexo (en: George y Wilson, 1988; Gilbert 1994).

Dos etapas marcan la diferenciación sexual en los mamíferos; 1) la diferenciación sexual primaria, que ocurre en el embrión e involucra la diferenciación gonadal con su influencia en la formación de los órganos genitales. 2) En la pubertad, sucede la diferenciación sexual secundaria que está relacionada con el desarrollo del fenotipo corporal. Ambas etapas producen finalmente el dimorfismo sexual de los mamíferos.

En los humanos, éste dimorfismo se logra gracias al correcto establecimiento de cuatro niveles de diferenciación: a) Cromosómico, b) Gonadal, c) Fenotípico y d) Psicosocial.

En el proceso de diferenciación sexual la diferenciación cromosómica resulta de la combinación de los cromosomas sexuales aportados en la fecundación por los

gametos que se unen y forman el cigoto. En los mamíferos, la presencia del cromosoma Y determina el sexo masculino y su ausencia el femenino.

El siguiente evento es la diferenciación gonadal. En etapas muy tempranas del desarrollo embrionario, la gónada pasa por un estado indiferenciado, pero con capacidad de formar ovario o testículo dependiendo de la información genética del individuo.

La diferenciación fenotípica es posterior a la diferenciación del testículo y el ovario, porque necesita de la secreción de hormonas gonadales específicas. La testosterona y la sustancia inhibidora del conducto de Müller (MIS, por sus siglas en inglés) sintetizadas en el testículo dirigen la diferenciación masculina; la ausencia de estas mismas hormonas y la producción de estrógenos por la hembra, resulta en la formación y el desarrollo normal de los órganos sexuales correspondientes. La adquisición de los caracteres sexuales secundarios que se presentan en la pubertad depende de las concentraciones de esteroides gonadales circulantes .

En el caso del ser humano la determinación social y psicológica está en función de su sexo de asignación y generalmente corresponde al sexo genético.

Formación Inicial de la Gónada

La gónada se desarrolla a partir de la cresta urogenital; las células somáticas que la componen derivan de las células mesodérmicas de dicha cresta, a diferencia de las células germinales primordiales (PGCs, por sus siglas en inglés), las cuales son de origen extraembrionario. En los mamíferos, la cresta urogenital se inicia con la proliferación del epitelio celómico en la zona ventral del mesonefros y del mesénquima que se encuentra por debajo de éste. Con la llegada de las PGCs a la

futura gónada, ésta queda constituida por células del epitelio celómico, células del mesénquima y las células germinales.

En los estados iniciales de la diferenciación gonadal no es indispensable la presencia de las PGCs ya que, la pérdida total o parcial de las mismas en la cresta genital no altera el desarrollo inicial del testículo o del ovario. Los ovocitos participan en la diferenciación y mantenimiento de las células foliculares y posteriormente llevan a cabo la foliculogénesis. En el ovario desprovisto de PGCs las células prefoliculares no se mantienen hasta el estado adulto, en cambio, en el testículo carente de PGCs sí se forman los cordones testiculares. (en: Mc Laren, 1991).

Una vez constituida la cresta genital y después del arribo de las PGCs, el blastema gonadal permanece en estado indiferente y no es posible reconocer estructuras ováricas o testiculares. En esta etapa, aparecen los cordones sexuales primarios como proliferaciones de células que surgen desde el mesonefros que esta por debajo de la gónada (Satoh, 1991) y que posteriormente rodean a las PGCs. En el caso del testículo estos cordones mantienen su desarrollo y se introducen al interior de la gónada formando los cordones sexuales medulares, los cuales se separan de la superficie gonadal cuando se forma la túnica albugínea.

La diferenciación del ovario es más tardía que la del testículo y en las primeras etapas del desarrollo sólo se le reconoce por la ausencia de estructuras testiculares. Se forman, al igual que en el testículo, los cordones sexuales primarios y posteriormente una segunda generación de cordones sexuales corticales, de los cuales se discute si son derivados de los primeros o bien de nueva formación, éstos permanecen cerca de la superficie gonadal en la región cortical.

Origen y Migración de las Células Germinales Primordiales

Inicialmente se pensó que las PGCs derivaban del epitelio celómico que cubre la región de la futura gónada. Actualmente es indudable el origen extragonadal de las mismas en distintas especies de mamíferos como la rata, el ratón, el conejo y el hombre, (en: Byskov y Hoyer, 1994)

Tradicionalmente se les ubica en el saco vitelino cerca de la alantoides, donde por primera vez se les puede distinguir morfológicamente, porque son de mayor tamaño que las células somáticas, tienen núcleo grande, citoplasma claro y responden positivamente a reacciones histoquímicas para la enzima fosfatasa alcalina. Con técnicas más recientes, usando anticuerpos monoclonales contra antígenos de su superficie celular, se han podido identificar a las PGCs cuando aún son morfológicamente parecidas al resto de las células somáticas en el epiblasto de ratón. Al día siete de desarrollo, se las localiza en el mesodermo extraembrionario cerca de la línea primitiva, donde se pueden ver alrededor de ocho células grandes, que también reaccionan positivamente a la presencia de fosfatasa alcalina y en caso de que esta zona sea removida, los animales carecen de PGCs, (Hahnel y Eddy, 1986; Ginsburg y col., 1990).

Desde su identificación en el endodermo del saco vitelino, las PGCs tienen capacidad de trasladarse con movimientos ameboideos migran por el endodermo del intestino hacia el mesodermo del mesenterio dorsal, para finalmente llegar al epitelio celómico de la cresta urogenital. Una vez que alcanzaron la región de la futura gónada estas células pierden su capacidad de movimiento e incrementan su actividad mitótica.

En el proceso de migración de las PGCs se reconocen dos tipos de movimientos. El primero se lleva a cabo cuando el cuerpo del embrión se cierra y las PGCs pasan pasivamente al interior del embrión con tejido de la alantoides y del saco vitelino que formará el intestino primitivo posterior y el primordio del mesenterio dorsal. El segundo, es la locomoción activa de las PGCs por movimientos ameboides, donde además del desplazamiento, es necesaria la correcta direccionalidad de las mismas para llegar a la gónada. Se han propuesto varias hipótesis que intentan explicar la ruta que siguen las PGCs y como llevan a cabo su migración. Esta podría deberse a un quimiotactismo positivo por medio de un gradiente de concentración de sustancias químicas reconocidas por las PGCs, que las dirigen hacia la gónada. En la cresta genital de embriones de ratón se ha detectado una sustancia parecida al TGF- β que *in vitro* atrae a las PGCs (Godin y col., 1990). Otra hipótesis propone que las células del mesénquima y de la matriz extracelular poseen señales moleculares que guían a las PGCs hasta la gónada. En este sentido, se destaca la acción permisiva de la fibronectina como sustrato que ayuda al desplazamiento de las PGCs, ya que en *Xenopus* se ha visto, que la adhesión y la migración de las mismas puede ser inhibida si se trata al mesenterio dorsal con anticuerpos antifibronectina (Heasman y col., 1981). También se considera que la orientación de las células del mesénquima y la disposición de la matriz extracelular podrían dirigir correctamente a las PGCs hacia la gónada. Lo más probable es que en el proceso de migración de las PGCs intervengan más de una de las causas mencionadas.

En las aves y los reptiles, las PGCs derivan de las células del epiblasto que migran de la región central de la zona pelúcida del embrión a la llamada creciente

germinal. Aquí se multiplican y entran al torrente sanguíneo cuando se forman los vasos sanguíneos en la creciete germinal. En estas especies las PGCs tienen la particularidad de atravesar la pared de los vasos sanguíneos, fenómeno conocido como diapédesis y viajan en el torrente sanguíneo hasta la región donde se está formando el intestino primitivo; en este momento salen de la circulación y migran por el mesenterio hasta llegar a la cresta genital. No se sabe exactamente la manera en que las PGCs son atraídas por la cresta genital, pero se propone que la gónada en desarrollo produce una sustancia quimiotáctica que atrae y retiene a las PGCs (en: Gilbert 1994).

Diferenciación Gonadal

Existen numerosos estudios que abordan la diferenciación gonadal, proceso que determina la formación del testículo y del ovario. Anteriormente se pensaba que la diferenciación hacia ovario era pasiva y ésta sólo se revertía si existían las condiciones necesarias para la diferenciación testicular. Actualmente se sabe que el desarrollo del testículo y del ovario son procesos genéticamente activos que involucran, además de los cromosomas sexuales, a genes autosómicos relacionados con la producción de MIS y del complejo P₄₅₀ aromatasas, (en: Gilbert, 1994; Gustafson y Donahoe, 1994).

Morfológicamente el primordio gonadal se organiza en:

- a) Tejido que rodea a las PGCs y que dará origen a las células de Sertoli en el testículo y a las células de la capa granulosa en el ovario.
- b) Tejido del estroma gonadal que formará tejido conectivo, vasos sanguíneos y el tejido intersticial esteroideogénico.

La línea precursora de las células de Sertoli es la primera en diferenciarse; estas células producen MIS y junto con la producción de testosterona por las células de Leydig, desencadenan los eventos moleculares y morfológicos que llevan a la formación del testículo y de los órganos reproductores masculinos (en: Gustafson y Donahoe, 1994).

Los datos presentes en la literatura indican que la región 1 del brazo corto del cromosoma Y, específicamente la zona llamada región sexual (SRY/Sry en hombre/ratón) es la responsable de dirigir la diferenciación testicular.

Una de las evidencias que apoyan esta hipótesis es que en los raros casos de varones fenotípicos con complemento cromosómico XX se ha encontrado traslocada la región SRY. Asimismo, en mujeres con complemento cromosómico XY esta región está ausente.

El producto génico de la región del SRY es un péptido de 223 aminoácidos conocido como factor determinante del testículo, (TDF por sus siglas en inglés); el que podría ser un factor de transcripción, porque contiene un dominio de unión al ADN similar al que se ha encontrado en otros factores de transcripción, como en el del grupo 1 de las proteínas de alta movilidad (en: Haqq y col., 1994).

En el embrión de ratón se ha detectado al TDF antes y durante la diferenciación testicular, previo a la producción de MIS por las células de Sertoli, éste sería el único momento en el cual se expresa este gen durante el desarrollo.

Experimentalmente se han logrado quimeras de ratones con líneas celulares XX/XY; éstas se desarrollan como machos fértiles aparentemente normales. Las células de Leydig en estos individuos pueden tener indistintamente genotipo XX o XY, mientras que las células de Sertoli sólo tienen genotipo XY. Con base en este

resultado, la expresión del SRY se daría únicamente en las células somáticas que se diferenciarán en células de Sertoli, de las cuáles se sabe que producen MIS. (en: Mc Laren, 1991).

La expresión del SRY en las células de Sertoli (síntesis de TDF), sería el evento disparador de la diferenciación testicular, y se propone que el TDF regula la síntesis de MIS (en: Mc Laren, 1991).

El MIS es una glicoproteína compuesta por dos subunidades idénticas de 70 KD cada una y pertenece a una superfamilia de factores de crecimiento que incluye a la inhibina, activina y el TGF- β , entre otros.

El MIS se detecta en el feto humano entre la 7a. y 8a. semanas de gestación. En el varón la concentración sérica de esta hormona se mantiene elevada aún después del nacimiento y decae en la pubertad. En la hembra no se detecta MIS durante el desarrollo y sólo en muy bajas concentraciones entre la pubertad y la menopausia. La administración *in vitro* de MIS a ovarios fetales disminuye la biosíntesis de aromatasas por lo que se secreta testosterona en lugar de estradiol, (en: Lee y Donahoe, 1993)

Koopman y col. (1991), construyeron ratones transgénicos insertando el gen del Sry a hembras genotípicas. Los animales resultaron ser machos fenotípicos normales, a pesar de su sexo cromosómico. Aún cuando los estudios sobre el SRY/Sry indican su participación en la determinación sexual, no deben descartarse otros genes que pudieran intervenir en la regulación de la formación de la gónada. La expresión de genes autosómicos como el "testis determining gen" (Tda-1) y el T-"associated sex reversal gen" (1-Tas) éste último ubicado en el cromosoma 17 del

ratón, cooperan con el SRY en la regulación de la diferenciación sexual de los mamíferos (Eicher y Washburn, 1986).

El gen WT-1, también interviene en la conformación de la gónada; éste se expresa previamente a la formación del primordio gonadal en el ratón; los individuos con alteraciones en este alelo presentan malformaciones gonadales. Más aún, una mutación dirigida del gen WT-1 en ambos alelos resulta en agenesis gonadal y renal. Esta mutación es letal y los embriones mueren en el útero (Kriedberg y col., 1993).

En estudios recientes de la expresión génica se ha encontrado un factor de transcripción que participa en la regulación de la transcripción de los complejos citocromo P₄₅₀ que intervienen en la esteroidogénesis. El factor esteroidogénico-1 (SF-1), es producto del gen Ftz-F1 que se expresa en la cresta urogenital del embrión de ratón desde antes de la formación de la gónada (día 9-9.5 de desarrollo), así como en las células fetales de Sertoli (Ikeda y col., 1994). En el ratón adulto también se expresa en las células de Leydig del testículo y en el ovario, en las células de la teca, de la granulosa y del cuerpo lúteo (Ikeda y col., 1993). El SF-1 parece ser necesario para la diferenciación embrionaria de la gónada, de las glándulas suprarrenales y en la formación del tejido esteroidogénico primario, (Luo y col., 1994). En ratones transgénicos carentes de SF-1, la región que debería formar la gónada sufre muerte celular en el tiempo correspondiente a su diferenciación. Los ratones nacen sin gónada y con genitales femeninos, pero mueren dentro de los primeros 8 días posteriores al nacimiento. Aún cuando la migración y la viabilidad de las PGCs no se ve afectada en principio sino hasta el momento en que deberían

arribar a la gónada, éstas se encuentran evidentemente disminuidas en número y se les ubica en el tejido mesonéfrico (Luo y col., 1994).

El primer indicio de dimorfismo gonadal es bioquímico más que morfológico, con la probable secreción preferencial de estrógenos por la gónada femenina y de andrógenos por la masculina. En el desarrollo temprano del ovario se detecta la actividad de enzimas esteroideogénicas en el feto humano, (George y Wilson, 1978), de conejo (Milewich y col., 1977), de bovinos (Shemesh y Hansel, 1983) y de cerdos (Moon y Raeside, 1972).

Juárez-Oropeza y col., (1995) muestran en embriones hembras de bovino la actividad del complejo aromatasas antes y durante la diferenciación ovárica. La producción de esteroides gonadales previa a la diferenciación sexual primaria fue informada en embriones de oveja por Attal, (1969) y en embriones de conejo por Gondos y col., (1983). Aún cuando la reversión sexual gonadal en mamíferos no es inducida por tratamientos con hormonas esteroides (Jost, 1970) y parecería ser independiente de estrógenos, los hallazgos antes descritos hacen suponer que la producción local de los estrógenos por la gónada indiferenciada puede estar implicada de alguna manera en la regulación de la diferenciación ovárica .

En vertebrados inferiores existen evidencias de la participación de los estrógenos en la diferenciación ovárica. Así, los embriones de cocodrilos tratados con estradiol 7 días después de la oviposición e incubados a la temperatura que normalmente produce animales machos, sufren reversión gonadal completa de hembras en el 100% de los casos. En estos animales, en las mismas condiciones experimentales, el tratamiento con inhibidores de aromatasas inhibe el desarrollo ovárico (Lance y Bogart, 1992).

En las aves el tratamiento con estrógenos no revierten el sexo tan claramente como en los cocodrilos, pero feminiza el testículo si se administran antes de la diferenciación gonadal (Wolff y Ginglinger, 1935). En el embrión de pollo, los estrógenos gonadales se detectan en el plasma desde el 7.5 día de incubación (Woods y Brazzil, 1981). El tratamiento con dietilestilbestrol al día 5 de desarrollo embrionario, induce la producción de estrógenos *in vitro* por el testículo del embrión de pollo al día 17 de desarrollo embrionario (Samsel y col., 1982). Experimentalmente se ha demostrado que los estrógenos intervienen en la organogénesis del ovario de las aves, ya que si se bloquea la producción de los mismos con inhibidores de aromatasa administrados antes de la diferenciación gonadal, se forman testículos funcionales que permanecen hasta el estado adulto en animales genéticamente hembras (Elbrecht y Smith, 1992).

Desarrollo del Ovario de las Aves

La mayoría de las aves presentan asimetría del sistema genital; la gónada y el oviducto derecho se atrofian durante el desarrollo embrionario y al momento de la eclosión son órganos rudimentarios que continúan involucionando y no participan en la vida reproductiva del animal adulto. Por lo tanto, el único ovario funcional de las aves, desde antes de la eclosión, es el ovario izquierdo. Éste se ubica dentro de la cavidad abdominal en posición cefálica con respecto a los riñones; lo irriga una rama de la arteria renal lumbar izquierda y lo drena la vena ovárica.

El ovario está cubierto por una capa de células epiteliales conocida como epitelio superficial o germinal. Por debajo de éste se encuentran la corteza y la

médula, las cuáles en el pollo joven se distinguen como zonas separadas, pero en el animal adulto se pierde esta distinción.

En la gallina adulta, la corteza está formada por tejido conectivo laxo, vasos sanguíneos, fibroblastos y los folículos ováricos, los cuales pueden considerarse como unidades independientes. Los folículos consisten en un ovocito rodeado por células foliculares y están envueltos en una membrana basal, por fuera de éstos se encuentra una capa más externa, que se diferencia a su vez en dos capas: la teca interna, abundantemente vascularizada, y la teca externa, de consistencia más fibrosa. En estos animales, la médula ovárica contiene células esteroidogénicas típicas agrupadas en cordones y células relativamente indiferenciadas que rodean a los mismos. También se encuentran vasos sanguíneos, linfáticos y sinusoides, paquetes de fibras nerviosas que inervan islotes de células esteroidogénicas típicas, vasos sanguíneos y músculo liso, e incluso algunos llegan a inervar la corteza (Hodges, 1974).

En el pollo el desarrollo gonadal se inicia con la aparición de la cresta urogenital, posteriormente se conforma la gónada indiferente (día 3-6 de incubación) a partir de la cuál se diferencia el ovario (día 6.5 de incubación).

El epitelio celómico que recubre el ovario, es sólo una capa de células cuboidales. En la gónada izquierda, desde muy temprano, se inicia la formación de la corteza que rodea por completo a la médula; mientras que en la gónada derecha sólo se observan algunos restos corticales. La corteza está formada por una segunda proliferación de cordones sexuales, o cordones ovígeros. Éstos rodean a las PGCs que se encuentran casi exclusivamente en la zona cortical desde la primera mitad de

la incubación. La corteza está separada de la médula por una capa de tejido conectivo conocido como falsa albugínea.

Desde el día 7 de incubación, la médula contribuye al incremento de tamaño de la gónada por la proliferación de los cordones medulares. Al día 9 de incubación, los cordones son más gruesos y más largos, y en la médula se distinguen dos zonas, la médula yuxtacortical, ubicada inmediatamente por debajo de la corteza y una capa reticular más interna donde se observan grandes espacios intersticiales formados por la distensión de los cordones medulares en la médula profunda (Romanoff, 1960).

En la médula ovárica de pollo recién nacido, se encuentra un compartimiento epitelial formado por cordones de células rodeadas por una lámina basal y espacios lacunares delimitados por células epiteliales. En la médula, ultraestructuralmente se distinguen dos tipos celulares: el primero, son células típicamente esteroideogénicas agrupadas en islotes, o bien aisladas como células intersticiales, que tienen mitocondrias con crestas tubulares, gran cantidad de cisternas de retículo endoplásmico liso y citoplasma con abundantes inclusiones de lípidos. El segundo tipo celular, lo forman nidos pequeños de células poco diferenciadas, rodeados por una lámina basal bien definida, (González y col., 1988).

El tamaño del ovario izquierdo aumenta de 2.5- 5.5 mm en promedio entre los 9-14 días de incubación a 37° C; en éstas mismas edades el ovario derecho es de la mitad de tamaño (Romanoff, 1960). El grosor de la corteza en el ovario izquierdo se incrementa cerca de 30 veces entre el 6-17 días de incubación principalmente por mitosis de las células del epitelio superficial y de las PGCs (Maraud y col., 1990).

En el ovario izquierdo del embrión de pollo, las ovogonias se encuentran agrupadas en " nidos" y tienen gran actividad mitótica, ya que incrementan su

número cerca de 25 veces entre el día 9 y el día 17 de incubación en que alcanzan su valor máximo. La multiplicación de las ovogonias se realiza por regiones a lo largo de la corteza del ovario. Después de la proliferación ovogonial, ocurre otro fenómeno conocido como atresia; éste afecta tanto a las ovogonias como a los ovocitos primarios, por lo que, disminuye el número de ovogonias ya que en el primer día posteclosión han degenerado el 30% de las mismas (Hughes, 1963).

La atresia ovogonial puede darse durante la mitosis o la interfase; las células que han entrado en proceso de degeneración se distinguen por cambios nucleares, y en etapas más avanzadas, el citoplasma se observa francamente vacuolizado. Los mecanismos que provocan la atresia no han sido esclarecidos (Gondos, 1978).

El proceso de ovogénesis se inicia cuando las ovogonias entran en meiosis y originan a los ovocitos primarios. Los primeros ovocitos aparecen en la zona central de la corteza y luego hacia el exterior de la misma. En el embrión de pollo, la ovogénesis se inicia entre los 13 y 14 días de incubación, la máxima conversión de ovogonias a ovocitos sucede el día 17 y termina alrededor del día 20 de incubación (Gondos, 1978).

Los hallazgos de Erickson (1974) permiten sugerir que en las aves la diferenciación de las células germinales sería independiente de estímulos hormonales, ya que en fragmentos aislados de corteza ovárica de embriones de pollo de 6 días de incubación, las células germinales se desarrollan normalmente hasta cigoteno, como sucede en los cultivos de fragmentos de gónada completa (corteza y médula), lo que lleva a pensar que el control de la diferenciación en estas células se encuentra en la corteza del ovario y que después del día 6 de desarrollo no depende de los estrógenos producidos en la médula.

Control Génico del Inicio de la Meiosis

En la literatura existe poca información acerca de la expresión génica durante la meiosis que nos permita explicar que determina el inicio de la misma. En nemátodos, las células germinales de los mutantes recesivos para el gen *glp-1* inician la meiosis sin que haya divisiones mitóticas, pero cuando se les traslada a tejido gonadal normal, las células germinales se dividen mitóticamente antes de iniciar la meiosis. Se propone que este gen está involucrado en la respuesta de las células germinales al estímulo de iniciación de la meiosis (Austin y Kimble, 1987). En estudios realizados en *Caenorhabditis elegans* se han descrito otras familias de genes que intervienen en la diferenciación de la línea germinal. La familia de los genes *fem* activa la expresión de los genes *fog*, estos últimos están implicados en la regulación de la diferenciación de la línea espermática ya que si se inhibe la expresión de los genes *fog* se produce la feminización de la línea germinal. Por lo tanto, el inicio de la ovogénesis sólo se dará si el producto génico de la familia *fem* está ausente y sobre todo del gen *fem3*. La traducción del gen *fem3* está regulada por la expresión del gen *mog-3*, el que dirige la síntesis de un factor inhibitorio de la traducción de *fem3* (Kimble y White, 1981).

En mamíferos se han descrito varios genes que se transcriben durante la espermatogénesis. Por ejemplo, el de las proteínas de choque térmico 70 que se expresa en espermatoцитos en paquitenio y el gen que codifica para la protamina, el que se expresa en las espermátidas (en: Erickson, 1990). En el testículo del ratón adulto se expresa el gen *meg1*, sobre todo en los espermatoцитos en paquitenio, pero se desconoce si también se expresa en los ovocitos (en: Byzkov y Hoyer, 1994).

Aún cuando esta información se refiere a genes que codifican para proteínas que se expresan durante la meiosis, no se conoce el papel que las mismas desempeñan en este proceso.

Biosíntesis y Función de los Estrógenos

Las hormonas esteroides se encuentran ampliamente distribuidas en la escala biológica, desde los insectos hasta los vertebrados superiores. Actúan sobre una amplia gama de tejidos ejerciendo diversas funciones vitales e incluso indispensables para la preservación de la especie.

El núcleo básico de los esteroides se forma con la fusión de tres anillos ciclohexano (A, B, C,) y un anillo ciclopentano (D) y forman la molécula del ciclohexanoperhidro-fenantreno. Con la adición de cadenas laterales a este núcleo básico se determinan los distintos tipos de esteroides.

El colesterol es el compuesto a partir del cual se sintetizan todas las hormonas esteroides. Este compuesto tiene 27 átomos de carbono, núcleo colestano y grupos metilo en los carbonos 10 y 13; en el carbono 17 se encuentra unida una cadena de 8 carbonos.

Los derivados pregnano (C_{21}) se forman por la pérdida de un segmento de la cadena lateral, entre C_{20} y C_{22} de la molécula del colesterol. Biológicamente se clasifican como progestinas e incluyen a la pregnenolona, progesterona, 17α -OH progesterona y 20α -dihidroprogesterona. Se destaca la importancia de la pregnenolona por ser el primer paso en la biosíntesis de las hormonas esteroides. La progesterona se sintetiza en el folículo y el cuerpo lúteo, y además de ser un intermediario biosintético, prepara al endometrio uterino para la implantación, su presencia es esencial para mantener el embarazo.

Los andrógenos derivan de las progestinas; éstas pierden la cadena del carbono 17 y forman el núcleo androstano, el cual contiene 19 átomos de carbono. Los andrógenos además de que se producen en el testículo, se sintetizan también en el foliculo ovárico y son el sustrato para la producción de estrógenos.

Con la pérdida del grupo metilo en C10 del androstano se conforma el núcleo estrano (C18), el cual pasa por un proceso de aromatización en el anillo A necesario para producir los estrógenos. En este grupo se incluye a la estrona, el estradiol y el estriol como los principales estrógenos naturales que se sintetizan en el ovario y la placenta. Éstos, además de ser indispensables para el desarrollo de los caracteres sexuales femeninos, están implicados en la regulación del ciclo sexual y el desarrollo de los tejidos que intervienen en la reproducción.

Las células que llevan a cabo la esteroidogénesis obtienen el colesterol a partir de: a) lipoproteínas circulantes en la sangre, b) colesterol intracelular almacenado en forma de ésteres de colesterol en inclusiones lipídicas citoplásmicas, c) síntesis de *novo* a partir de acetato. Las células esteroidogénicas ováricas obtiene el colesterol a partir de las lipoproteínas circulantes principalmente.

Como ya se mencionó, el primer paso en la biosíntesis de las hormonas esteroideas es la formación de pregnenolona, lo que se realiza en la membrana interna de las crestas mitocondriales. La cadena lateral del colesterol se corta por dos reacciones de hidroxilación en los carbonos 22 y 20, eliminando así seis carbonos para formar un compuesto C21. Este proceso requiere de: a) el citocromo P₄₅₀_{SCC} que es una hemoproteína que hidroxila y puede cortar los enlaces C-C., b) una flavoproteína que actúa como transportadora de electrones y c) una hemoproteína cuya actividad es intermediaria entre los pasos a y b. El paso limitante en la

producción de esteroides es la escisión de la cadena lateral del colesterol, lo que ocurre de la misma forma en ovario, testículo y glándulas suprarrenales.

Una vez formada la pregnenolona (P_3), puede entrar a alguna de las dos vías esteroideogénicas básicas; la vía Δ^5 ó de la pregnenolona, que forma dehidroepiandrosterona (DHEA) a partir de P_3 , o bien la misma pregnenolona transformarse a progesterona (P_4) y entrar a la vía Δ^4 , que forma androstenediona a partir de P_4 . Tanto la pregnenolona como la progesterona son los precursores fundamentales en la biosíntesis de esteroides.

En la formación de testosterona a partir de pregnenolona intervienen cuatro enzimas de localización microsomal, la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ^5 - 4 isomerasa (3β -HSD), 17α -hidroxilasa $17,20$ -liasa ($P450c17$) y 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD). Como ya se mencionó, los estrógenos se forman por la aromatización de los andrógenos con la participación del $P450aro$.

El 17β -estradiol es el estrógeno biológicamente más potente. Se sintetiza en el ovario y se interconvierte a estrona que tiene menor actividad biológica. En esta interconversión hay preferencia por la formación de 17β -estradiol. Sus principales tejidos blancos son: el útero, la vagina, las mamas y el cerebro (en: O'Malley y Strott, 1993).

Se han descrito efectos rápidos y tardíos de los estrógenos sobre sus tejidos blancos; los primeros se observan inmediatamente después de la administración de estrógenos ya que no requieren la síntesis de proteínas de *novo*; por ejemplo, la acumulación de agua en el útero.

Los efectos tardíos se manifiestan horas después e involucran síntesis de proteínas específicas como la producción de moléculas receptoras a estradiol y progesterona, (en: Clark y Markaverich, 1988).

La acciones de los estrógenos sobre el ovario han sido estudiadas por varios autores. En el animal adulto los estrógenos estimulan la proliferación de las células granulosas del ovario de rata, (Pencharz, 1940; Williams, 1940; Bradbury, 1961; Goldenberg y col., 1972, Merk y col., 1972). Más aún, en ratas hipofisectomizadas, el 17β -estradiol es capaz de incrementar el contenido de su propio receptor y potencializar la respuesta de las células granulosas a hFSH (Richards, 1975b).

La primera evidencia de que los estrógenos están involucrados en la regulación de la diferenciación gonadal en el embrión de pollo, se obtuvo en machos genéticos con la inducción del desarrollo gonadal hacia ovario por la administración de 17β -estradiol y dietilstilbestrol (DES) a embriones de cinco días de edad (Wolff y Ginglinger, 1935; Van Tienhoven, 1957). Sin embargo, mientras que la administración de antiestrógenos como el tamoxifén a embriones no produce regresión sexual en hembras (en: Scheib, 1983), la inyección de inhibidores de aromatasas provocó la reversión sexual morfológica y fisiológica permanente hasta la edad adulta, (Elbrecht y Smith, 1992).

Esteroides Gonadales Durante el Desarrollo Embrionario de las Aves

En las aves, se acepta que el patrón básico de desarrollo gonadal es el testículo y sólo se diferenciará a ovario si existen condiciones adecuadas para ello. El sexo masculino se origina con el genotipo homogamético ZZ y el genotipo, ZW induce el sexo femenino.

La secreción endócrina de la gónada embrionaria en las aves es más temprana y activa en el ovario, comparada con el testículo de la misma edad (Scheib, 1983). Este hecho es diferente a lo que se conoce acerca de la actividad endócrina del ovario de mamíferos, en los que la diferenciación genital en sentido femenino se realiza aún en ausencia del ovario (Jost 1970; Luo y col., 1994). En las aves desarrollo ovárico está influenciado por el ambiente hormonal, ya que creando experimentalmente un medio ambiente estrógeno en un embrión de pollo, se obtiene una feminización morfológica y endócrina transitoria de la gónada masculina, (Wolff, 1979).

Los primeros estudios sobre la presencia de las hormonas sexuales en la gónada del embrión de pollo fueron con reacciones inmunohistoquímicas. En etapa de gónada indiferente, las gónadas de ambos sexos reaccionan positivamente a estrona y 17 β -estradiol, tres días antes de su diferenciación morfológica. Una vez que el ovario se ha diferenciado, la reacción es más intensa en ovario izquierdo (Woods y Erton, 1978).

Varios autores sugieren que las gónadas de embriones jóvenes de pollo tienen capacidad de sintetizar esteroides durante su diferenciación morfológica, e incluso antes de la misma. Wolff (1979), encontró que la cresta urogenital de embriones de 2.5 días de incubación, reacciona positivamente por métodos histoquímicos a la enzima 3 β -HSD. Esto también se observa a los 6.5 días de incubación. La actividad de 3 β -HSD, parece restringida a las células intersticiales derivadas de los cordones medulares de embriones femeninos antes del día 6.5 de desarrollo. En el testículo, esta actividad se registra débilmente en las células de los cordones en embriones de la misma edad y se hace más evidente entre el día 7-8 de

incubación. Después de esta fecha, el tejido intersticial es el que revela intensamente la presencia de la enzima 3β -HSD (Scheib y Haffen, 1969).

Analizando la producción de hormonas esteroides, a partir del 7.5 día de incubación el testículo produce principalmente testosterona (Guichard y col., 1977; Woods y col., 1983). Sin embargo como se mencionó anteriormente, se considera que la actividad esteroidogénica de éste es más tardía y de menor intensidad comparada con la del ovario (Scheib, 1983). Aún así, no debe descartarse la influencia hormonal en el desarrollo de la gónada masculina. Maraud y col., (1990) demostraron que es posible inducir la formación del testículo, en embriones de 3 días de incubación, injertando testículo de embriones de pollo de 17 días de desarrollo. En este estudio, los embriones femeninos formaron testículos en lugar de ovarios. Los autores proponen que quizá la MIS producida por el testículo sea la causante de la reversión sexual, ya que el conducto de Müller involuciona. Estos resultados permiten sugerir que en las aves la diferenciación testicular es también un proceso activo como en los mamíferos, a pesar de la poca producción de testosterona por el testículo de embriones jóvenes.

La capacidad de la gónada femenina para transformar *in vitro* precursores radiomarcados en hormonas sexuales, implica la actividad de las enzimas que participan en la síntesis de esteroides, (Guichard y col., 1973). El futuro ovario sintetiza desde el día 5 de incubación, estrógenos a partir de progesterona, y desde el día 6.0 a partir de acetato de sodio (Weniger y Zeis, 1971).

Después de la primer semana de incubación, varios autores probaron la formación preferencial de estrona y estradiol por el ovario de pollo, (Cedard y Haffen, 1966; Galli y Wassermann, 1973; Guichard y col., 1977). Conforme avanza

ésta, la secreción hormonal es acorde a la diferenciación sexual del embrión. En el testículo se produce principalmente testosterona y dihidrotestosterona, mientras que en el ovario izquierdo predomina la estrona y el 17β -estradiol (Woods y Erton, 1978).

Retomando la esteroidogénesis ovárica, Galli y Wasserman (1973), mostraron que desde el día 7 de incubación en el ovario izquierdo se detecta la presencia de 20-dihidroprogesterona, 17-hidroxiprogestero, 17β -estradiol y estrona, mientras que el ovario derecho entre los 7-10 días de incubación, metaboliza progesterona a dihidroprogesterona y al día 10, sintetiza estradiol y testosterona.

Guichard y col. (1977), cuantificaron por radioinmunoanálisis la producción *in vitro* de esteroides por la gónadas de embriones de pollo entre 7.5-18 días de incubación. Después de 24 horas de incubación los principales esteroides secretados al medio de cultivo fueron: estradiol, testosterona y dehidroepiandrosterona, mientras que progesterona y estrona se producen en menor cantidad. Durante el desarrollo embrionario, la síntesis de esteroides gonadales en ambos sexos se incrementa gradualmente. La gónada femenina mantiene concentraciones más altas de estrógenos que la gónada masculina, aunque también produce testosterona. El testículo en cambio, produce relativamente mayor cantidad de testosterona y dihidrotestosterona que de estrógenos. La relación testosterona/estradiol es siempre mayor de uno en el testículo y después del día 10 de incubación también en ovario derecho, mientras que en ovario izquierdo esta relación es menor de uno.

La producción de estrógenos ováricos se correlaciona con la concentración de estradiol plasmático. Éste se incrementa continuamente desde el 7.5 día de

desarrollo en el ovario del embrión de pollo, pero no en el testículo, en el que permanecen a niveles más bajos y relativamente constantes, (Woods y Brazzill, 1981). Los mismos autores indican que la concentración de estradiol plasmático durante el desarrollo embrionario muestra un comportamiento bifásico; la primera fase ocurre entre los 7.5-12.5 días y muestra un incremento lento; la segunda fase se observa entre los 13.5-17.5 días y muestra un aumento más pronunciado en la concentración del estrógeno.

El ovario derecho crece continuamente hasta el día 9 de desarrollo embrionario, después involuciona y queda como órgano rudimentario desde antes de la eclosión (día 21 de incubación). Su capacidad esteroidogénica es más parecida a la del testículo que a la del ovario izquierdo y desde el día 10 de desarrollo embrionario produce más testosterona en relación al 17β -estradiol (Guichard y col., 1977). Para el día 15 de desarrollo, la producción de testosterona por este órgano es similar a la del testículo (Teng, 1982) y a los 18 días de incubación, el ovario derecho tiene una marcada reducción en su secreción de esteroides sexuales y de su contenido proteico y su respuesta al estímulo con gonadotropinas está disminuida (Velázquez y col., 1995).

La secreción hormonal ovárica está bajo control hipofisiario por intermediación de las acción de las gonadotropinas. La hormona luteinizante y la hormona estimulante del foliculo (LH y FSH, por sus siglas en inglés) pudieron ser demostradas por medio de técnicas inmunocitoquímicas en la bolsa de Rathke a los 4 días de incubación (Gasc y Sar 1981; Woods y col., 1985). La concentración sérica de LH se detectan a partir del día 10 de incubación (Tanabe y col. 1986). La concentración de LH sérica no se incrementa en el embrión de pollo desde el día 10

hasta el día 18 de incubación (Woods y col., 1989) y tiende a reducirse conforme aumenta la edad del embrión (Tanabe y col., 1986).

La respuesta del ovario a las gonadotropinas se puede demostrar a partir de los 7.5 días de incubación. El tratamiento con LH produce un aumento en la concentración plasmática de 17β -estradiol (Woods y col., 1981) y lo mismo se observa agregando la gonadotropina al medio de cultivo de ovarios de 7 días (Weniger y Chouraqui 1988). La evidencia que permite sugerir la presencia de receptores a LH en el ovario del embrión de pollo desde el 8.5 día de incubación la aportó Woods (1987) quien demostró por métodos inmunocitoquímicos la unión específica de LH a células ováricas. En un estudio similar, la unión de FSH al ovario pudo visualizarse desde los 6.5 días de incubación (Woods y col., 1991).

Teng (1982) estudió la respuesta de las gónadas de embriones de pollo de 15 días de incubación a las gonadotropinas hipofisiarias, y encontraron que ésta es diferente en ambos ovarios. El ovario izquierdo es hasta cinco veces más sensible al estímulo de LH y FSH de mamífero que el ovario derecho y la producción de estradiol y testosterona se incrementa significativamente con la administración de LH.

González y col. (1987), midieron la secreción de estradiol *in vitro* por el ovario izquierdo de embriones de pollo entre los 13-21 días de incubación y encontraron que el estímulo de LH incrementaba significativamente la producción de 17β -estradiol en todas las edades, pero el máximo estímulo se obtuvo a los 13 días de incubación.

Woods y Brazzill (1981) sugieren que el incremento en la concentración de estradiol sanguíneo en embriones de pollo a los 13.5 días de incubación podría deberse a un aumento de la producción hipofisiaria de hormona luteinizante.

Los estudios de Weniger muestran que entre el día 10 y el día 13 de desarrollo embrionario la hipófisis influye en la esteroidogénesis ovárica (Weniger y col., 1989, Weniger y col., 1990a, Weniger y col., 1990b). Experimentos minuciosos, practicados en embriones de pollo hipofisectomizados, muestran que a los 11.5 días de desarrollo embrionario la secreción de estrógenos es menor en los animales carentes de hipófisis que en los animales con operación simulada e intactos; estos resultados permiten sugerir que a esta edad la secreción hormonal del ovario está regulada por la hipófisis, (Weniger y col., 1991).

Mecanismo de Acción de los Estrógenos

La naturaleza lipídica de los esteroides les permite entrar a las células por difusión, a través de la membrana plasmática y permanecer en sus tejidos blanco, ya que forman complejos estables pero reversibles con proteínas receptoras específicas. Los estrógenos son transportados desde su sitio de producción a sus órganos blanco por proteínas plásmáticas transportadoras específicas como la globulina fijadora de hormonas sexuales y por proteínas séricas no específicas, como la albúmina; con esta última tienen baja afinidad de unión y rápida disociación por lo que se les considera en estado libre.

Se estima que en el plasma el estradiol libre es el estrógeno biológicamente activo, ya que puede difundir libremente al interior de las células. La fracción unida a proteínas constituye por lo tanto el reservorio hormonal circulante.

Los efectos celulares inducidos por el 17β -estradiol son mediados por mecanismos que involucran la formación de complejos hormona-receptor relacionados con la activación o represión de genes específicos.

La respuesta hormonal requiere la unión de la hormona (ligando) con su receptor para formar el complejo hormona receptor (H-R). Dicha unión produce un cambio alósterico en las moléculas receptoras, indispensable para su activación como factores de transcripción. Los genes que responden a hormonas esteroides contienen elementos reguladores que intervienen en la respuesta hormonal. Los promotores son elementos indispensables para la transcripción; ya que determinan la tasa basal y la exactitud de la iniciación de la transcripción, los aumentadores de la respuesta a hormonas esteroides son sitios fijadores de los complejos hormona-receptor y se denominan elementos de respuesta a esteroides (ERE); en cambio los elementos silenciadores tienen acción opuesta a éstos y reducen o apagan la tasa de transcripción del gen en ausencia de la hormona. Cuando se activa el ERE se supera la acción del silenciador y se lleva a cabo la transcripción. Además existen elementos aumentadores independientes de la presencia de la hormona, los que estimulan la tasa máxima de transcripción del gen. (en: O'Malley y Strott, 1993).

Como se mencionó anteriormente, los receptores intracelulares de esteroides se transforman a su forma activa cuando se unen a su ligando específico, este proceso involucra la separación de las proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) del dominio del receptor que une a la hormona. El receptor activado, interacciona con las secuencias específicas del ADN correspondientes a los elementos de respuesta a la hormona, localizados dentro o cerca de la región

promotora de los genes que responden a estrógeno. Un ejemplo de ello, en el pollo es una secuencia de 15 pares bases identificada como el elemento de respuesta a estrógeno del gen de la vitelogenina (Klock y col., 1987). Estas secuencias están estrechamente relacionadas con el elemento de respuesta a esteroides para glucocorticoides del gen de la tirosina aminotransferasa de rata.

En las aves se han aislado tres formas de receptores de estrógenos, (McNaught y col., 1990). En el oviducto del pollo se encontraron dos formas bien caracterizadas de receptores de alta y baja afinidad (Rx y Ry), con propiedades funcionales particulares. La forma Rx tiene una constante de disociación al equilibrio (Kd) de 0.006×10^{-9} M y coeficiente de sedimentación de 4.2 S; esta forma es utilizada preferencialmente por los antiestrógenos. La forma purificada Rx intensifica específicamente la actividad de la RNA polimerasa II. Por el contrario, las especies de baja afinidad Ry (Kd = 0.8×10^{-9} M), las cuales exhiben un coeficiente de sedimentación de 3.5 S, están involucradas en la transcripción del gen estrógeno-dependiente (McNaught y col., 1990). Además, en el citosol del oviducto de pollo se aisló un tercer tipo de receptor a estrógeno; es una forma que no se une al estradiol y puede ser convertida a la forma de baja afinidad Ry por un proceso dependiente de ATP/Mg⁻². Se ha mostrado que tal interconversión llamada "potenciación" es regulada por reacciones de fosforilación y defosforilación (Dayani y col., 1990). De hecho, la fosforilación de residuos de tirosina en los receptores de estrógenos incrementa la unión de la hormona a niveles máximos (Migliaccio y col., 1989).

Después de la unión al ADN, el receptor activado puede interaccionar con los factores de transcripción básicos. Esta interacción parecería estabilizar la

maquinaria de transcripción en el gen promotor permitiendo a la RNA polimerasa B (II) iniciar la transcripción (Beekman y col., 1993).

El Receptor de Estrógeno en las Aves

Los receptores de estrógenos son miembros de una superfamilia de proteínas que se unen al ADN y funcionan como factores que inducen la transcripción. Estas moléculas presentan características estructurales comunes a todos los grupos de receptores de hormonas esteroides (andrógenos, progesterona, glucocorticoides y mineralocorticoides), así como a otras proteínas reguladoras; tales como, los receptores de 1,25-dihidroxi vitamina D₃, hormona tiroidea y ácido retinóico (Carson-Jurica y col., 1990).

El aislamiento del ADN complementario (cDNA) de los receptores de estrógeno ha permitido conocer más acerca de su estructura y organización funcional. Así sabemos en el pollo, que el receptor de estrógenos es una proteína de 589 aminoácidos (aa) con un peso molecular estimado en 66,669 Daltons (Krust y col., 1986). Su tamaño es muy similar al del receptor a estrógeno humano (595 aa y PM 66,182 Daltons) y entre ambas proteínas existe un 80% de homología en sus residuos de aminoácidos (Green y col., 1987). La comparación entre las secuencias de aminoácidos del receptor a estrógeno del pollo y del humano indican la presencia de regiones altamente conservadas. Se identificaron tres regiones de alta homología, A (87%), C (100%) y E (94%) y tres regiones de baja homología B (56%), D (38%) y F (41%), (Green y col., 1987). La región amino terminal A (37 aa) del receptor a estrógeno en el pollo se requiere para su interacción con elementos de la maquinaria de transcripción. Esta región, junto con la región B, parecen ser necesarias para obtener la máxima estimulación de la transcripción en genes sensibles a estrógenos.

La región hidrofílica C, es rica en cisteína, arginina y lisina, además funciona como el dominio de unión al ADN. Este dominio tiene dos dedos de zinc, cada uno de éstos unido a residuos de cisteína. La región C (66 aa) es responsable del reconocimiento de las secuencias del gen blanco por el receptor a estrógeno y parece ser esencial para la activación de la transcripción. El dominio de unión a la hormona se localiza en la región carboxilo terminal de la molécula. La región hidrofóbica (E) es necesaria para la máxima unión del estradiol al receptor a estrógeno. Finalmente, la región hidrofílica D, que separa el dominio de unión al ADN y el dominio de unión a la hormona, probablemente contenga una señal de localización nuclear determinante para la entrada del receptor a estrógeno al núcleo (Krust y col., 1986; Picard y col., 1990).

Localización del Receptor de Estrógeno en el Ovario de los Mamíferos

Stumpf (1969) mostró autorradiográficamente que el [³H]17β-estradiol se une al núcleo de las células foliculares de la capa granulosa en el ovario de ratas inmaduras, y con menor intensidad a las células tecales e intersticiales. En los ovocitos y células del estroma no se observó ninguna marca.

Richards (1975b), estudió el contenido de los receptores de estrógenos en las células de la granulosa y encontró que la cantidad de receptor se modifica con gonadotropinas hipofisarias e incluso con el mismo estradiol. La FSH incrementa el contenido celular del receptor de estrógenos, contrastando con el marcado decremento producido por la LH, mientras que el 17β-estradiol incrementa la transcripción de su propio receptor.

La presencia del receptor a estrógeno también ha sido evidenciada en las células luteínicas (Lee y col., 1971; Scott y Rennie, 1971; Richards, 1975a).

Aún cuando la localización autoradiográfica del receptor a estrógeno en los ovocitos fue negativa (Gasc, 1980), Se ha demostrado que ovocitos de humano y de ratón contienen el mRNA para el receptor a estrógeno (Wu y col., 1992, 1993).

Hasta donde he revisado, la presencia del receptor de estrógenos en las células de la teca e intersticiales del ovario aún no ha sido estudiado.

En en el feto de ratón la ontogenia de los receptores de estrógenos se exploró inyectando [³H] DES a ratonas gestantes con seguimiento autoradiográfico posterior (Stumpf y col., 1980; Holderegger y Keefer, 1986). En ambos estudios se informa que no se observó marca radioactiva nuclear en el ovario, pero sí una presencia débil en las células intersticiales del testículo. Los autores discuten la posibilidad de interferencia por los estrógenos endógenos con la unión del DES marcado al núcleo de las células ováricas.

Greco y col (1991), realizaron la inmunodetección de los receptores de estrógenos en el feto de ratón utilizando un antisuero contra un péptido sintético correspondiente a la región de bisagra del receptor a estrógeno. Estos estudios muestran en el tracto reproductivo y ovario de fetos de ratón (15-17 días), una proteína con peso molecular de 60 Kd que podría corresponder a la del receptor de estrógenos.

Los ovarios de fetos de ratón de 15 días de edad y en menor proporción los de fetos de 17 días, mostraron tinción inmunocitoquímica nuclear específica para estrógenos. En fetos de 13 y 19 días se encontró poca tinción (Greco y col., 1993).

Sin embargo, aunque el papel de los estrógenos en el desarrollo de la gónada y del tracto reproductivo de mamíferos requiere más investigaciones, la presencia del receptor a estrógeno durante el período de diferenciación del ovario sugiere que pueden ser importantes.

Presencia del Receptor de Estrógeno en el Ovario de Pollo

La primera evidencia de la incorporación específica de estrógenos fue aportada por Jonsson y Terenius (1965). Después de la inyección corporal de [^3H]17 β -estradiol en pollitos de una semana de edad, el ovario contenía casi 3 veces más radioactividad que el músculo esquelético a las dos horas posteriores a la inyección.

Kamiyoshi y col., (1986) describieron la unión nuclear de 17 β -estradiol en las células de la granulosa en folículos preovulatorios del ovario de gallina. Gasc, (1980) por métodos autoradigráficos demostró los sitios de unión para 17 β -estradiol en las gónadas del embrión de pollo durante la diferenciación sexual. El núcleo marcado se encontró en gónadas, tanto de embriones machos como de hembras de 5.5 a 7 días de incubación. Las células blanco de los estrógenos se observaron en el epitelio germinal de la gónada izquierda, pero no en el de la gónada derecha. También se localizaron en la médula de ambas gónadas. Dentro de los cordones medulares, numerosas células mostraron marca nuclear específica para estrógenos. Las células germinales fueron difíciles de identificar en los cortes por congelación,

pero no parecen estar marcadas por el estradiol tritiado. A los 10 días de incubación, sólo el remanente del epitelio germinal en el testículo izquierdo mostró estradiol radiomarcado. Es interesante que la unión de 17β -estradiol fue observada durante el periodo de diferenciación ovárica. Esta observación coincide con los resultados de Greco y col., (1993) quienes encontraron receptores de estrógenos en el ovario de ratón de 15 días, pero no en el día 19 del desarrollo fetal.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diferenciación gonadal de los vertebrados está determinada genéticamente, aún cuando recibe influencia de factores hormonales que ayudan a lograr una correcta formación tanto del ovario como del testículo. De las hormonas gonadales, el 17β -estradiol es el esteroide ovárico con mayor actividad biológica y cuya presencia se ha descrito desde el inicio de la diferenciación morfológica del ovario.

La secreción de estrógenos por la gónada femenina y la presencia de proteínas unidoras de los mismos en las células que la integran, hacen suponer que estas hormonas pueden ser necesarias para la conformación del ovario en desarrollo. Si bien es conocida la actividad esteroideogénica en el ovario del embrión de pollo y su respuesta a los estímulos gonadotrópicos, se requieren más evidencias sobre el papel de los estrógenos en el desarrollo del ovario de embriones de pollo, de la presencia de receptores de estrógeno en este órgano, así como discriminar las subpoblaciones celulares que los contienen.

Con este estudio se pretende analizar el efecto del 17β -estradiol administrado durante el desarrollo embrionario sobre las diferentes poblaciones celulares que integran el ovario de pollo recién nacido. Por otra parte, es de interés obtener evidencias de la presencia del receptor a estrógenos en las mismas .

Para abordar este problema, se trataron embriones de pollo con 17β -estradiol y se cuantificaron los cambios en el número de células somáticas y germinales del ovario fetal a partir de los 13 días de incubación y hasta el nacimiento. Asimismo, se hizo un estudio morfométrico en cortes semifinos de corteza y médula ovárica a la misma edad. También se estudio la secreción de estrógenos *in vitro* por la suspensión celular del ovario. Con respecto a la presencia

del receptor a estrógeno en las células del ovario se hicieron dos aproximaciones experimentales: una, mediante la unión específica de [³H]17β-estradiol a la suspensión de células ováricas y la otra, con inmunolocalización del sitio receptor a estrógeno.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Estudiar los efectos del 17β -estradiol sobre la organogénesis del ovario de las aves.

Objetivos Particulares:

- 1.- Cuantificar el número de células somáticas y germinales en el ovario de embriones de pollo a partir de los 13 días de incubación hasta el nacimiento.
- 2.- Evaluar los efectos de la administración 17β -estradiol en etapa embrionaria sobre el número de células somáticas y germinales del ovario de embriones de pollo, desde el día 13 de incubación hasta el día de la eclosión,.
- 3.- Evaluar el efecto de la administración de 17β -estradiol al embrión de pollo sobre los estadios de la profase I de la meiosis en los ovocitos primarios del pollo recién nacido.
- 4.- Medir en animales testigo y animales tratados con estrógeno durante la etapa embrionaria, la secreción de 17β -estradiol por las células del ovario de pollo recién nacido. En condiciones basales y estimuladas con gonadotropina coriónica humana (hCG),

5.- Cuantificar el área de células pregranulosas, ovocitos primarios, células esteroidogénicas típicas y células epiteliales relativamente indiferenciadas en cortes semifinos de la corteza y la médula del ovario de pollo recién nacido normal y tratado con estrógeno durante la etapa embrionaria.

6.- Investigar la presencia del receptor a estrógenos en una suspensión de células ováricas de pollo recién nacido mediante la unión específica de [^3H]17 β -estradiol.

7.- Calcular la unión específica de [^3H]17 β -estradiol en la fracción nuclear y citosólica de células ováricas de pollo recién nacido.

8.- Cuantificar la unión específica de [^3H]17 β -estradiol a la fracción nuclear y citosólica, de las subpoblaciones celulares purificadas del ovario inmaduro de la pollita al nacimiento

9.- Estimar la presencia del receptor a estrógeno en cortes ultrafinos de ovario de pollo recién nacido utilizando la técnica de inmunolocalización con oro coloidal para microscopía electrónica en animales testigos y pretratados con 17 β -estradiol.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron huevos fértiles de gallinas raza White Leghorn, Babcock B 300 adquiridos en ALPES, S.A., Tehuacán, Puebla. Los huevos se colocaron en una incubadora Jamesway a 38.7 °C con circulación de aire forzado y 80% de humedad relativa. Al día 11 de incubación se seleccionaron los huevos embrionados (aproximadamente 160 embriones por experimento), para llevar a cabo el tratamiento con 17 β -estradiol oel vehículo.

Para la administración de soluciones al huevo se utilizó el método de cámara falsa; la técnica consiste en hacer una perforación en la cámara de aire y cortar un pequeño triángulo en la región ecuatorial del cascarón. Con una gota de agua estéril se humedece la membrana papirácea y posteriormente se succiona el aire de la parte roma del huevo para que el embrión descienda y se separe la membrana corioalantoides. Se retiran el cascarón, la membrana papirácea y finalmente se sellan los orificios con cinta adhesiva transparente.

Los embriones se dividieron en dos grupos experimentales:

Grupo testigo: embriones que recibieron 100 μ l de solución etanólica al 4% sobre la membrana corioalantoides, a los 11, 13 y 15 días de incubación.

Grupo experimental: embriones que recibieron 200 ng de 17 β -estradiol en 100 μ l de solución etanólica al 4% sobre la membrana corioalantoides a los 11, 13 y 15 días de incubación. Después de la administración de las soluciones se continuó con la incubación normal del huevo.

Los animales se sacrificaron por decapitación a los 13, 15, 17 días de incubación y dentro de las primeras 24 horas posteriores al nacimiento; el ovario se

disecó cuidadosamente verificando que estuviera íntegro y sin contaminación de otros tejidos.

Cuantificación de las Subpoblaciones de Células Ováricas

Los ovarios se recibieron en una caja de Petri con solución de fosfatos de sodio, libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (PBS), se hicieron grupos de 3 ovarios y se incubaron en 3 ml de solución de tripsina al 0.25% en PBS, en frascos de vidrio por 20 a 30 min a 37°C en baño maría con agitación de 90 ciclos/min. El tejido se pasó cada 10 min a través de pipetas Pasteur con punta flameada hasta su disgregación total, posteriormente se agregó inhibidor de tripsina de frijol de soya (Gibco), disuelto en medio de cultivo Dulbecco modificado de Eagle (DMEM; Gibco) adicionado con 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA; Sigma), hasta obtener una dilución final de 4 ml de solución por ovario.

El material de vidrio utilizado en la disgregación celular fue previamente siliconizado (Sigmacote, Sigma). De esta suspensión se tomaron alícuotas para la cuantificación y clasificación de las células ováricas, éstas se cargan por duplicado en un hemocitómetro para su observación directa al microscopio óptico con objetivo de 40X.

Las células se clasificaron en:

- 1) Células germinales: en este grupo se incluyen a los ovocitos, éstos tienen un diámetro mayor a $25\ \mu\text{m}$, presentan núcleo excéntrico y se distingue claramente el cuerpo de Balbiani en su citoplasma.

2) Células somáticas con inclusiones de lípidos: células con un diámetro de 20 μm o menos y con más de 5 inclusiones de lípidos en su citoplasma.

3) Células somáticas sin inclusiones de lípidos: en este grupo se incluyeron todas las células que no entran en las categorías 1 y 2 con excepción de los eritrocitos que no se consideraron en ninguna de las cuantificaciones.

La cuantificación del número de células por cuadrante (1mm^2) se realizó por el método de doble ciego y en total se contaron cuatro cuadrantes por muestra; los datos obtenidos se multiplican por el factor de dilución y se informan como número de células por ovario.

Subfases de la Profase I de la Meiosis en los Ovocitos

Para esta parte del estudio se trabajó en forma individual con ovarios de pollos de un día de nacidos; la disgregación de los mismos se llevó a cabo frotándolos sobre una malla de nylon y recogiendo el material disgregado en 1 ml de PBS. La suspensión celular se incubó en solución hipotónica de cloruro de potasio y se fijó con metanol-ácido acético 3:1 v/v según Evans y col., (1964). Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min y el botón celular se extendió sobre un portaobjeto, la preparación se dejó secar al aire y se tiñó con Giemsa. Los ovocitos se observaron en el microscopio óptico a 1000X y se registraron los diferentes estadios de la profase I de la meiosis según las siguientes características:

Leptoteno: el inicio de la condensación del material genético hace que los cromosomas se hagan aparentes, los telómeros se unen a la membrana nuclear y se forman los elementos laterales de los complejos sinaptonémicos. Al microscopio

óptico los cromosomas aparecen como fibras delgadas arregladas en forma de ramillete.

Cigoteno: se forman los complejos sinaptonémicos entre los cromosoma homólogos; éste los mantiene unidos y estrechamente alineados y se lleva a cabo el apareamiento entre zonas estrictamente homólogas. Al microscopio, los cromosomas se observan como fibras más gruesas y separadas que en leptoteno.

Paquiteno: la sinapsis se ha llevado a cabo en todos los cromosomas homólogos que ahora aparecen como cromosomas bivalentes. Éstos no se condensan homogéneamente y aparecen zonas de mayor condensación formando los cromómeros. Al microscopio óptico os cromosomas son fácilmente distinguibles por su aspecto de hebra con cuentas más teñidas. En esta fase se lleva a cabo el entrecruzamiento genético

Diploteno: se inicia la separación de los cromosomas homólogos por disolución de los complejos sinaptonémicos. Estos permanecen unidos en los quiasmas que son zonas donde se produjo el entrecruzamiento. Los quiasmas son visibles al microscopio óptico.

Se contaron 100 ovocitos por preparación, a doble ciego, y se informan como porcentaje de células que se encuentran en los diferentes estadios de la profase I de la meiosis.

Secreción de Hormonas Esteroides.

Las células disgregadas del ovario inmaduro de pollo recién nacido, se incubaron en frascos de vidrio con medio de cultivo DMEM, suplementado con BSA al 0.1%, 1 µg de MIX (metil, isobutil,xantina) en una atmósfera compuesta por

95% de aire y 5% de CO₂, durante dos horas a 37 °C. Se separaron en dos grupos experimentales. El primero en condiciones basales y el segundo grupo en condiciones de estimulación con 2.0 UI/ml de gonadotropina coriónica humana (hCG, Sigma). Al final de la incubación, se separan las células por centrifugación y el sobrenadante se guarda congelado a -20 C hasta la cuantificación del 17β-estradiol por radioinmunoanálisis. El 1, 2, 6, 7, [N] [³H]17β-estradiol (98 μCi/mM) fue comprado a New England Nuclear, Dupont y el 17β-estradiol radioinerte a Steraloids Inc; el anticuerpo se adquirió en Radioassay Inc.

Estudio Morfométrico

Las áreas celulares se midieron sobre cortes semifinos teñidos con azul de toluidina (0.5-1 μm de grosor) de fragmentos de ovario fijados en glutaraldehído al 2.5%, postfijados en tetraóxido de osmio 1% e incluido en resinas plásticas (Poly/Bed 812, Polysciences). Las muestras se observaron al microscopio óptico a 1000X; mediante una cámara de video adaptada al ocular, se envió la señal a un monitor policromático para hacer las mediciones respectivas utilizando el programa BIOCROM para la digitalización de imágenes. Se midieron tres áreas de 3000 μm² cada una, tanto para la corteza como para la médula de cada ovario, en ocho animales tratados y ocho animales testigo. En todas las mediciones se restó el área ocupada por los espacios lacunares y los vasos sanguíneos.

En la corteza del ovario se tomaron las siguientes medidas: área celular de ovocitos y área de células pregranulosas. Estas últimas envuelven a los ovocitos y son fácilmente discriminadas por color, ya que su citoplasma tiene mayor afinidad por el azul de toluidina que el de los ovocitos. En la médula se midieron el número y

área de las células esteroideogénicas típicas y el número de células epiteliales relativamente indiferenciadas que se encuentran formando los cordones medulares.

Captación Específica de 17β -estradiol por Células Intactas del Ovario

En 1 ml de medio de cultivo DMEM, se incubaron en un frasco de vidrio, de 2-4 millones de células con [^3H]17 β -estradiol (98 $\mu\text{Ci}/\text{m mol}$) 2 nM a 4°C. Estas muestras se utilizaron para medir la unión total del esteroide a las células ováricas (UT). Un frasco más se incubó en las mismas condiciones pero agregando un exceso de 100 veces estradiol radioinerte para cuantificar la unión no específica (UNE).

Después de la incubación las células se lavaron 3 veces con resuspensión vigorosa en 1 ml de solución tris-salina (Tris HCl 20 mM, NaCl 9%, pH 7.4) y se centrifugaron a 2000 rpm, durante 5 min a 4°C. Después del último lavado se agregaron 500 μl de etanol absoluto al botón celular para extraer el esteroide radiomarcado y se cuantificó la radiactividad; la unión específica se calculó restando UT-UNE y se informa como cantidad de estradiol unido por millón de células.

Se probaron distintos tiempos de incubación y el tiempo óptimo para la misma se fijó en una hora para los experimentos siguientes.

Caracterización del Complejo de Unión Hormona-Receptor.

Para comprobar que la proteína unidora de estradiol correspondía con la del receptor de estrógenos descrita en la literatura, se determinó el coeficiente de sedimentación de la misma por centrifugación en gradiente lineal de sacarosa 20-35% (Medina y col., 1981). Se emplearon 100 ovarios izquierdos de pollo Rhode Island recién nacido, los que se disecaron y recibieron en PBS fría y luego se pasaron a solución amortiguadora de TEDMG (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1.5 mM,

ditiotrietol 0.25 mM, $\text{Na}_2 \text{MoO}_4$ 10 mM, glicerol 10% y como inhibidores de proteasas se agregaron E-64, leupeptina, aprotinina y APMSF (Boehringer). El tejido se secó con papel filtro, se pesó y se homogenizó en 2ml de TEDMG en un politrón Brinkman, durante 2 seg, a velocidad 1 sobre hielo, esta operación se repitió tres veces. La separación del citosol se llevó a cabo centrifugando el homogenado una hora a 105 000 g a 4 °C. Se separó el sobrenadante pasándolo a un tubo limpio. Posteriormente se incubaron alícuotas del citosol (500 μl) a 4 °C durante toda la noche con concentraciones saturantes de [^3H]17 β -estradiol (5 nM), ó [^3H]tamoxifen aziridina (10 nM, actividad específica, 24 Ci/mmol) y dos tubos más en iguales condiciones, pero agregando un exceso de 100 veces de estradiol radioinerte.

Después de la incubación el citosol se trató con una suspensión de carbón-dextran (0.25% y 0.025% respectivamente) en solución TEDGM, se incubó 10 minutos más y se centrifugó a 3000 rpm 10 minutos, a 4 °C.

Se tomaron alícuotas del citosol incubado y tratado con carbón-dextran; se depositaron sobre gradientes de sacarosa de 20-35% y se centrifugaron en tubos sellados por 3 horas a 370,000 g a 4 °C. El contenido del tubo se recibió por goteo en frascos de vidrio con 5 a 7 gotas por frasco, se agregaron 5 ml de Aquasol y finalmente se contaron las muestras 10 minutos cada una, en contador de centelleo líquido (Beckman modelo 6000IC). Como testigo positivo se empleó el citosol del oviducto de los mismos animales.

Especificidad de la Unión de 17 β -estradiol en Células del Ovario

Para determinar la especificidad de la unión del [^3H]17 β -estradiol se hicieron pruebas de desplazamiento con otros esteroides: dietilstilbestrol (DES), 17 β -estradiol (E_2) y dihidrotestosterona (DHT). Esta prueba se realizó incubando un número conocido de células íntegras, aisladas del ovario de pollo de un día de edad, con [^3H]17 β -estradiol 2 nM en presencia o ausencia de concentraciones de 10 a 400 veces mayores que el estradiol radiomarcado, de los esteroides radioinertes mencionados. Después de la incubación las células se lavaron tres veces con solución tris-salina y se cuantificó la radiactividad en el botón celular.

Captación Específica de 17 β -estradiol en Subpoblaciones de Células Ováricas

La captación específica de [^3H]17 β -estradiol se estudió en células intactas, en la fracción nuclear y el citosol de cuatro subpoblaciones de células ováricas purificadas. Para cada experimento se sacrificaron por decapitación 100 pollos hembras de un día de nacidos, se disecaron los ovarios izquierdos y se recibieron en solución salina isotónica fría incubándolos con solución de tripsina en PBS al 0.25% m/v, en baño de agitación de 90 ciclos por minuto a 37 °C, durante 15-20 minutos. La suspensión celular se filtró en malla de nylon para quitar los restos de tejido, posteriormente se aplicó sobre un gradiente de metrizamida de 0-15% en DMEM-BSA y se centrifugó 20 min a 2,500 x g.

A lo largo del gradiente las células se separaron en cuatro bandas representativas de los principales tipos celulares del ovario. Se denominaron como fracciones celulares I, II, III y IV.

La fracción I contiene células esteroideogénicas típicas de la médula con más del 90% de pureza.

La fracción II contiene a los ovocitos primarios con una pureza del 95-100%.

En las fracciones III y IV se incluyen células pregranulosas y células epiteliales relativamente indiferenciadas de los cordones medulares, así como fibroblastos. En la fracción III predominan las células pregranulosas y en la fracción IV predominan las células epiteliales relativamente indiferenciadas. La contaminación por células de las fracciones I y II, en estas fracciones fue menor del 10 %.

Las fracciones celulares se manejaron en lo sucesivo a 4 °C; cada una se lavó en medio de cultivo DMEM con 0.1% de albúmina y una vez más en medio de cultivo puro.

La cuantificación de la captación de [³H]17β-estradiol en el compartimiento nuclear y el citosólico de las células íntegras, en cada una de las fracciones mencionadas, se hizo incubando un número conocido de células, que variaba según la cantidad de material obtenido en las diferentes fracciones. Las incubaciones se hicieron en medio de cultivo DMEM con [³H]17β-estradiol 2nM/l (UT), y agregando o no 17β-estradiol radioinerte en una concentración de 400 nM/l (UNE), a 37 °C, durante una hora en baño de agitación continua de 90 ciclos por min. Al término de la incubación, las células se lavaron tres veces en solución tris-salina fría, centrifugando cada vez a 2000 rpm por 5 min.

El [³H]17β-estradiol se extrajo de las células agregando 500 µl de etanol al botón celular y posteriormente 10 ml de líquido de centelleo (Aquasol; Dupont) para

contar la radiactividad. Los resultados se expresan como pmol de [³H]17β-estradiol/millón de células.

Para la cuantificación del estradiol unido a la fracción nuclear, se obtuvieron los núcleos después de la incubación, con el método descrito por Medina y col., (1981). Los resultados se refieren como femtomolas de [³H]17β-estradiol captado por µg de ADN; éste último cuantificado según método de Santoianni y Ayala (1965).

En cada una de las fracciones se obtuvo el citosol, sonicando las células en solución amortiguadora con molibdato de sodio e inhibidores de proteasas, 2 serinaproteasas y 2 cisteinaproteasas y centrifugando a 105 000 g durante 1h a 4°C. Aliquotas del citosol se incubaron con [³H]17β-estradiol 2nM toda la noche a 4°C; finalmente se removieron los esteroides libres con carbón-dextrán como se describió anteriormente. El estradiol radiomarcado unido se midió en el sobrenadante de las muestras, la radiactividad se contó en un contador de centelleo líquido, 10 min por muestra, agregando líquido de centelleo Aquasol (Dupont). En todos los casos, la captación específica de 17β-estradiol se calculó restando a la unión total la unión no específica (UT-UNE).

Inmunolocalización del Receptor a Estrógeno por Microscopía Electrónica

Para la localización ultraestructural del receptor de estrógeno en el ovario, se emplearon 50 huevos de gallina White Leghorn y se dividieron en dos grupos. El grupo experimental se trató con 200 ng de 17β-estradiol en 100 µl de solución etanólica al 4% los días 11, 13 y 15 de desarrollo embrionario; el grupo testigo recibió en estas mismas edades sólo la solución utilizada como vehículo.

El día de la eclosión, se obtuvieron fragmentos del ovario izquierdo de 1 mm², se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 2 horas sobre hielo; posteriormente se deshidrataron con alcoholes graduales y se incluyeron en resina hidrofílica LR White (Polysciences). Desde su obtención y hasta antes de la inclusión las muestras se manejaron a 4 °C.

La inmunolocalización del RE se llevó a cabo en cortes ultrafinos de 60-90 nm de grosor utilizando rejillas de níquel recubiertas con una película delgada de polivinyl formvard (Polysciences). En la reacción inmunológica se emplearon dos anticuerpos: el primero fue un anticuerpo policlonal desarrollado contra una secuencia específica de aminoácidos del dominio de unión al DNA del receptor a estrógeno humano (Traish y Wotiz, 1989) y el segundo anticuerpo como marcador secundario conjugado con partículas de 15 nm de oro coloidal para evidenciar al primero. Los cortes se observaron en un microscopio electrónico Zeiss EM10, y se fotografiaron a 10 000 aumentos, posteriormente las placas se amplificaron 2.5 veces dando un aumento total de 25 000. Las facilidades para realizar este trabajo así como los anticuerpos utilizados fueron proporcionados por el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

En la corteza se tomaron micrografías electrónicas de las células pregranulosas y los ovocitos primarios. En la médula, de las células esteroideogénicas típicas y las células epiteliales relativamente indiferenciadas. La cuantificación de los granos de oro se hizo con lente de aumento y una plantilla cuadrículada. Sobre las micrografías-se colocó papel transparente y se marcó con distintos colores el área ocupada por el núcleo y el citoplasma de cada tipo celular. Posteriormente se midió en cada micrografía el área ocupada por cada uno de estos compartimientos, con

ayuda de una tableta digitalizadora Hewlet Packard adaptada a la computadora y empleando el programa Autocad. Se reporta el número promedio de granos de oro por μm^2 de por lo menos 10 células para cada compartimiento.

Análisis Estadístico

Las diferencias estadísticas en los resultados se estimaron con análisis de varianza (ANOVA) seguida de la prueba de Tukey para contrastes múltiples, ó bien con la prueba de t de "Student" según se indica en cada caso. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias con una $P < 0.05$ %.

RESULTADOS

Cuantificación de las Subpoblaciones de Células Ováricas

Durante el desarrollo del embrión de pollo es evidente el aumento en el número total de células presentes en el ovario. La cantidad total de células se incrementa desde el día 13 de incubación alcanza su número máximo al día 17. Luego de esa edad, el número de células ováricas se mantiene relativamente constante hasta el nacimiento. Comparando los animales testigo con los que recibieron el tratamiento con 17β -estradiol durante la incubación, se observa que en ambos grupos la proliferación celular tiene el mismo comportamiento hasta el día 17 de incubación. Posteriormente, el número de células ováricas en los embriones tratados con estrógenos sigue aumentando hasta el nacimiento, edad en la que los animales tratados tienen un mayor número de células que los animales testigo ($P < 0.05$).

En la Fig. 1 se muestra la imagen de la suspensión celular observada al microscopio óptico, clasificadas en distintos tipos celulares según el criterio explicitado en Materiales y Métodos. Cuando se hace una cuantificación diferencial de las células ováricas, separando las células germinales de las células somáticas, se observa que el número de células germinales aumenta entre el día 13 y 17 de incubación. A esta edad, la cantidad de células germinales llega al valor máximo y luego disminuye hasta el día de la eclosión. Las células germinales de las aves pretratadas con estrógenos llegan a su número máximo al día 17 sin diferir de las aves testigo y su número disminuye al término del periodo de incubación. La diferencia que se observa al nacimiento no es estadísticamente significativa (Fig.2).



Figura 1.- Las células ováricas se disgregan hasta formar una suspensión homogénea. Al microscopio óptico se distinguen los ovocitos primarios (O), células somáticas con abundantes inclusiones de lípidos (cl) y células somáticas sin lípidos (sl).

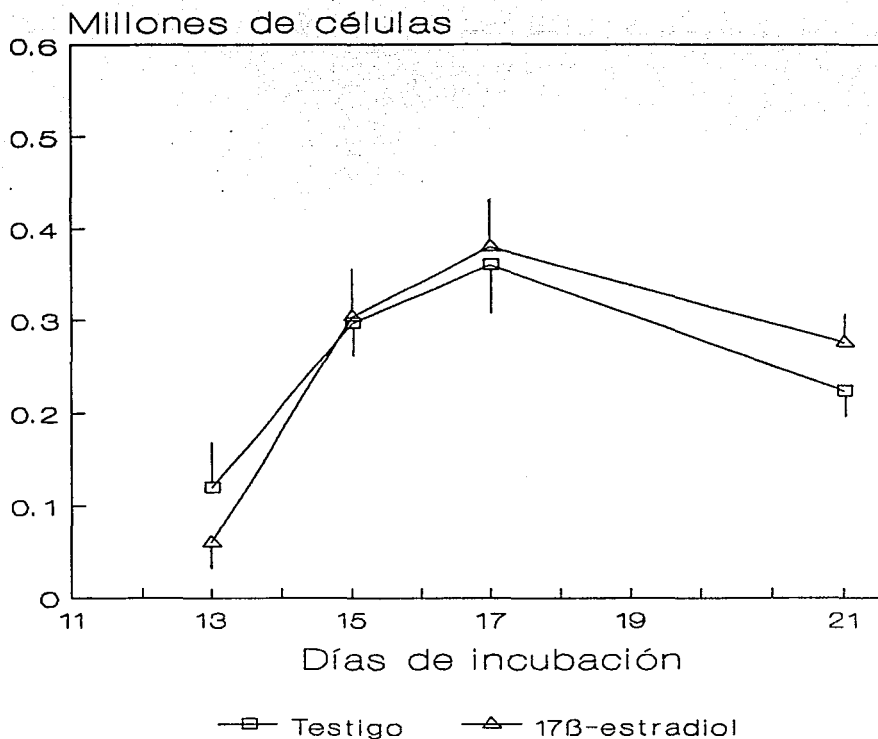


Figura 2.- La figura muestra el número de células germinales durante el desarrollo en embriones normales y tratados con 200 ng de 17β-estradiol a los 11, 13 y 15 días de incubación. Los valores representan la media \pm error estandar medio. No se observan diferencias significativas entre ambos grupos en cada una de las edades estudiadas. Prueba de t de Student .

El número de las células somáticas del ovario se incrementa durante el desarrollo embrionario a partir del día 13 de incubación y alcanza su número máximo al día 17 y se mantiene relativamente sin cambio hasta el día 21. En los embriones tratados con 17β -estradiol, el número de células somáticas se comporta de manera similar a los testigos entre los días 13-17, después de esa fecha, continúa aumentando de número y al día 21 la cantidad de células somáticas está significativamente aumentada con respecto al grupo testigo ($P < 0.05$) (Fig.3).

En la suspensión de células ováricas, es posible distinguir dos subpoblaciones de células somáticas; una está formada por células de aproximadamente $20\ \mu\text{m}$ de diámetro con más de cinco inclusiones lipídicas en su citoplasma y corresponde a las células esteroideogénicas típicas de la médula ovárica. La otra subpoblación está formada por células más pequeñas ($10\text{-}15\ \mu\text{m}$ de diámetro) y en su citoplasma, las inclusiones lipídicas sólo se observan ocasionalmente. Esta subpoblación incluye a las células pregranulosas, a las células epiteliales relativamente indiferenciadas de la médula y a los fibroblastos.

El número de células con abundantes inclusiones de lípidos (esteroideogénicas típicas) no se encuentra modificado por el tratamiento con estrógenos. Sin embargo, el día de la eclosión el número de células somáticas sin inclusiones de lípidos es significativamente más alto en los animales que recibieron 17β -estradiol a los 11, 13 y 15 de incubación (Fig.4).

Subfases de la Profase I de la Meiosis en los Ovocitos

El día del nacimiento la mayor parte de las células germinales se ha diferenciado a ovocitos primarios. Los ovocitos de los animales testigo y tratados

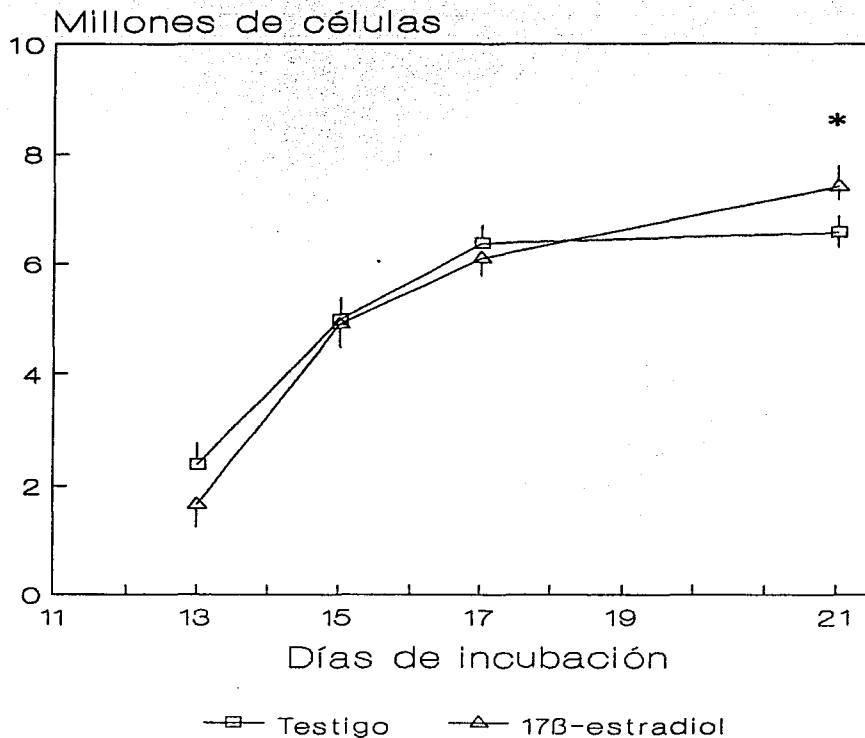


Figura 3.- El número de células somáticas del ovario de pollo recién nacido aumenta durante el desarrollo embrionario. La administración de 200 ng de 17β-estradiol a los 11, 13 y 15 días de desarrollo embrionario incrementa el número de estas células a los 21 días de incubación. Los valores representan la media ± error estandar medio. * $P < 0.05$, prueba de t de Student .

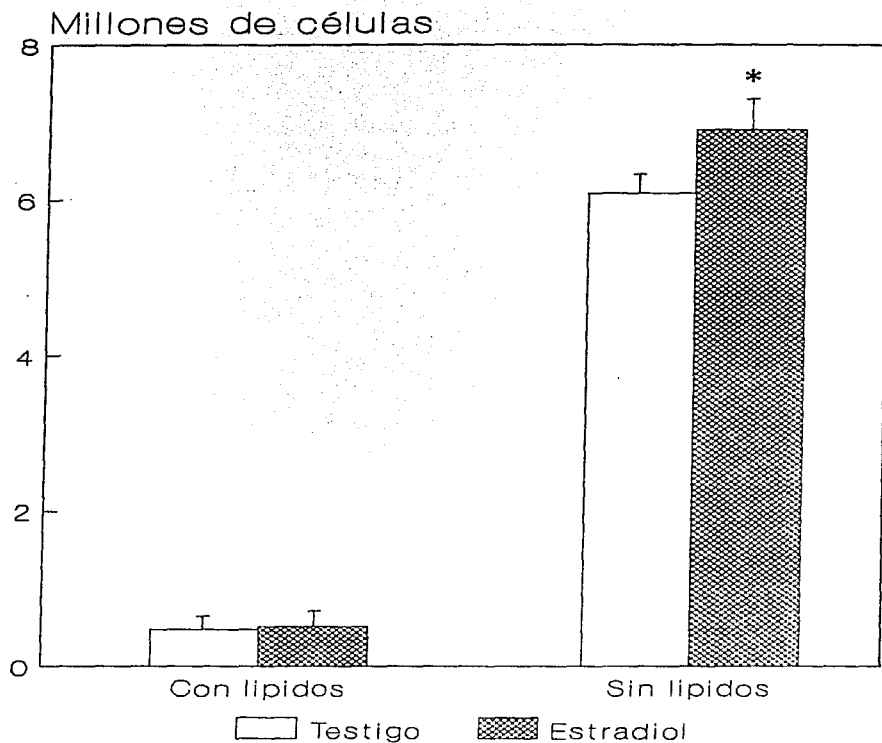


Figura 4.- Las barras muestran el número de células somáticas con y sin abundantes inclusiones de lípidos en su citoplasma, en el ovario de pollo recién nacido, de embriones testigo y tratados con 200 ng de 17β -estradiol a los 11, 13 y 15 días de desarrollo. Los valores representan la media \pm error estándar medio.* $P < 0.05$, prueba de t de Student .

con estradiol se encuentran en la profase I de la primera división meiótica (Fig.5). El porcentaje de ovocitos encontrado en cada una de las subfases de la meiosis es similar en los animales testigo y los tratados previamente con 17β -estradiol (Tabla I).

Tabla I.- Estadios de la profase I de la meiosis (expresados en porcentaje) en ovocitos primarios del ovario de pollo recién nacido.

Tratamiento	n	Leptoteno	Cigoteno	Paquiteno
Testigo	6	4.5 ± 1.5	83.2 ± 5.4	12.2 ± 5.6
17β -estradiol	10	7.0 ± 2.1	83.5 ± 3.2	8.7 ± 2.0

Los resultados muestran la media ± el error estandar medio.

La mayoría de los ovocitos ha alcanzado a esta edad la subfase de cigoteno (83 %), y en menor proporción se observan ovocitos en leptoteno (4.5-7.0 %) y paquiteno (12.2-8.7 %).

Secreción de 17β -estradiol

Se cuantificó el 17β -estradiol secretado al medio de incubación, por las células ováricas del pollo recién nacido, en tiempos cortos (2 h). Tanto las aves testigo como las aves pretratadas con estrógenos, secretan 17β -estradiol al medio de incubación. No hubo diferencias significativas en la secreción basal de 17β -estradiol entre las aves testigo y las pretratadas con estrógeno (Tabla II) (Fig. 6).

Al agregar hCG (2 UI/ml) al medio de incubación la secreción de 17β -estradiol se incrementa en ambos grupos experimentales. El grupo testigo, aumentó 2.8 veces la cantidad de 17β -estradiol en el medio de cultivo ($P < 0.01$), sobre su secreción basal por efecto de la hCG. En las mismas condiciones de incubación, las aves que recibieron estrógeno durante el desarrollo embrionario incrementaron 4.9 veces, la cantidad de 17β -estradiol segregado al medio de cultivo sobre su secreción



Figura 5.- Las células germinales se han diferenciado a ovocitos desde antes del nacimiento y han entrado a la primera división meiótica. En el día de la eclosión la mayoría de ellos está en cigoteno (A). También se observan ovocitos en leptoteno y paquiteno (B).

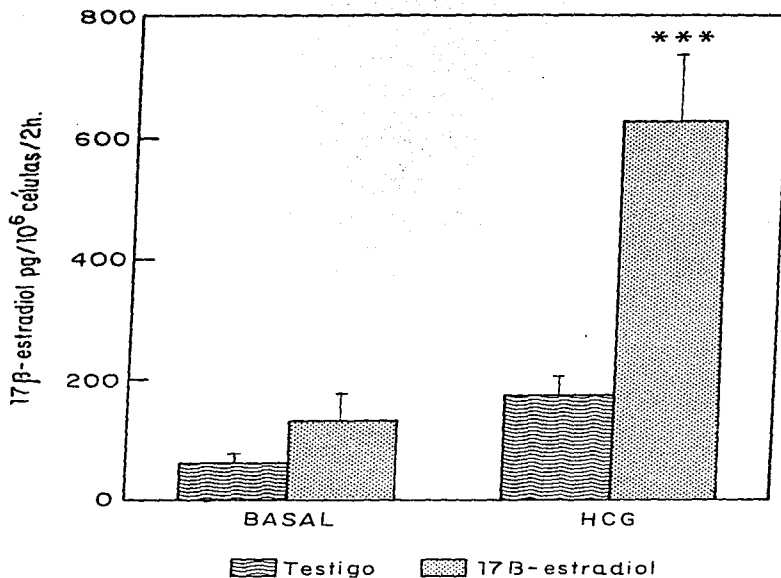


Figura 6.- Secreción de 17β-estradiol por las células ováricas del pollo recién nacido, en condiciones basales y estimuladas con 2 UI de hCG. Las células de los animales que recibieron 200 ng de 17β-estradiol a los 11, 13 y 15 días de desarrollo embrionario secretan mayor cantidad de estradiol en condiciones de estimulación * *

* P<0.001, prueba de t de Student .

basal. Este valor es significativamente mayor comparado con el del grupo testigo ($P < 0.01$) (Fig. 6).

Tabla II.-Secreción de 17β -estradiol al medio de incubación, en condiciones basales y estimuladas con 2 UI de hCG.

Tratamiento		n	17β -estradiol (pg/2h/10 ⁶ células)
Testigo	Basal	6	63.43 ± 26.49 a b
Testigo	hCG	6	174.0 ± 74.20 b
17β -estradiol	Basal	7	131.5 ± 104.8 b
17β -estradiol	hCG	7	626.0 ± 301.0 c

Los resultados muestran la media ± la desviación estandar. El análisis de varianza y la prueba de Tukey indican que los valores marcados con distinta letra son estadísticamente diferentes.

Estudio Morfométrico

En este estudio, en cortes histológicos de la corteza y la médula yuxtacortical del ovario de pollo de un día de edad, se cuantificó el número de ovocitos, de células pregranulosas, de células epiteliales relativamente indiferenciadas y de células esteroideogénicas típicas por unidad de área, (Figs. 7 y 8). Asimismo, se midió el área celular y se calculó el promedio en cada uno de estos tipos celulares con excepción del área de las células epiteliales relativamente indiferenciadas (Tabla III).

En la corteza de los animales testigo, encontramos un promedio de 5.6 ovocitos por cada 1000 μm^2 , valor semejante al cuantificado en las aves pretratadas con estrógeno. Tampoco se observan modificaciones en el número de las células pregranulosas que se encuentran en la corteza rodeando a los ovocitos. Sin

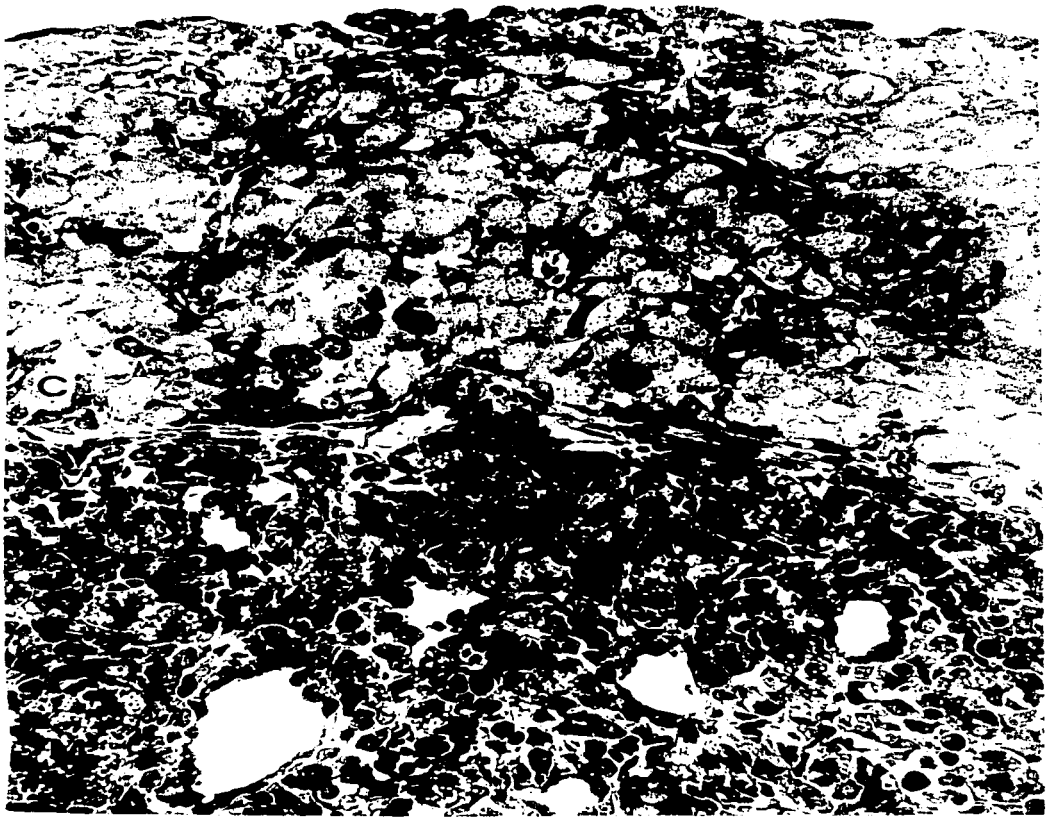


Figura 7.- En el ovario de pollo recién nacido se distinguen claramente dos zonas, la corteza (C) y la médula (M). La primera contiene a los ovocitos primarios y a las células pregranulosas; en la médula se observan células esteroideogénicas típicas y células epiteliales relativamente indiferenciadas.

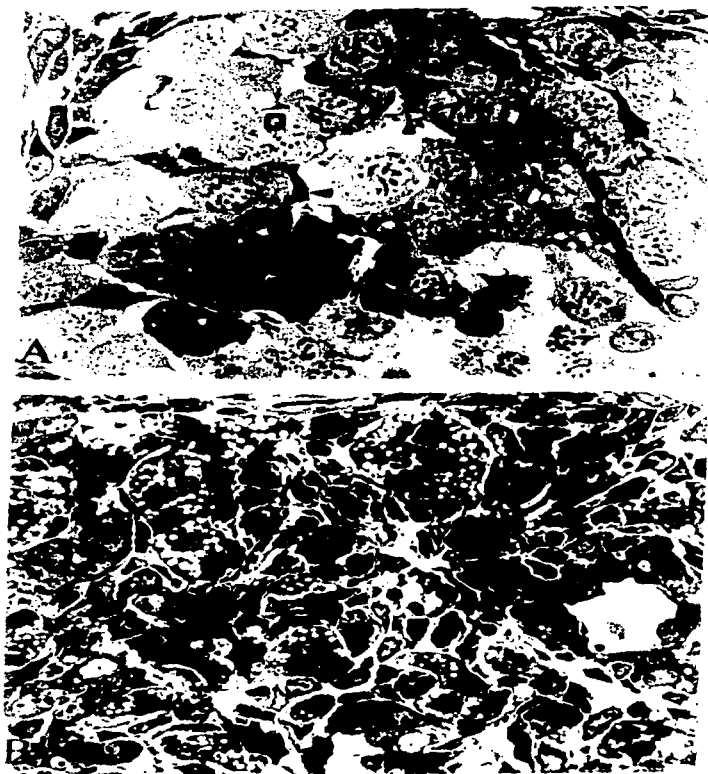


Figura 8.- En la corteza del ovario de pollo recién nacido(A) se encuentran los ovocitos primarios (O) y las células pregranulosas (▲). En la médula (B) se encuentran los islotes de células esteroideogénicas típicas (S) y las células epiteliales relativamente indiferenciadas (†).

embargo, el área celular promedio en las células pregranulosas está aumentada por efecto del tratamiento con estrógenos ($P < 0.001$) (Tabla III).

En los ovocitos no se encontraron modificaciones en el área celular promedio, ni tampoco en el área ocupada por el cuerpo de Balbiani (Fig.9).

En la médula, las células epiteliales relativamente indiferenciadas responden al tratamiento con estrógeno aumentando significativamente su número con respecto a los animales testigo ($P < 0.001$) (Fig. 10). El número y el área celular promedio de las células esteroideogénicas típicas en los embriones pretratados con estradiol no difiere estadísticamente del grupo testigo (Tabla III).

Tabla III.- Morfometría en cortes semifinos del ovario de pollo recién nacido tratado con 17β -estradiol.

Tipo Celular	n	Número de células/1000 μm^2		Área Celular (μm^2)	
		Testigo	17β -estradiol	Testigo	17β -estradiol
Ovocitos I	7	5.6 ± 0.3	5.6 ± 0.3	152 ± 7.7	144 ± 4.5
C. Pregranulosas	7	3.1 ± 0.4	2.6 ± 0.3	50 ± 4.5	78.0 ± 3.8 ***
C. Esteroideogénicas	10	2.4 ± 0.2	2.0 ± 0.3	97 ± 3.7	115 ± 9.3
C. Indiferenciadas	10	12 ± 0.7	16.1 ± 0.7 ***	-----	-----

Los resultados muestran la media \pm el error estándar. *** $P < 0.001$, prueba de t de Student.

Receptor a Estrógeno

Se realizaron varios experimentos para establecer el tiempo de incubación necesario para visualizar la incorporación de [^3H] 17β -estradiol en este modelo de suspensión de células ováricas. En un primer ensayo, se estudió la unión específica de [^3H] 17β -estradiol por las células del ovario; la cual aumenta conforme transcurre el tiempo de incubación. El incremento más importante en la captación del esteroide

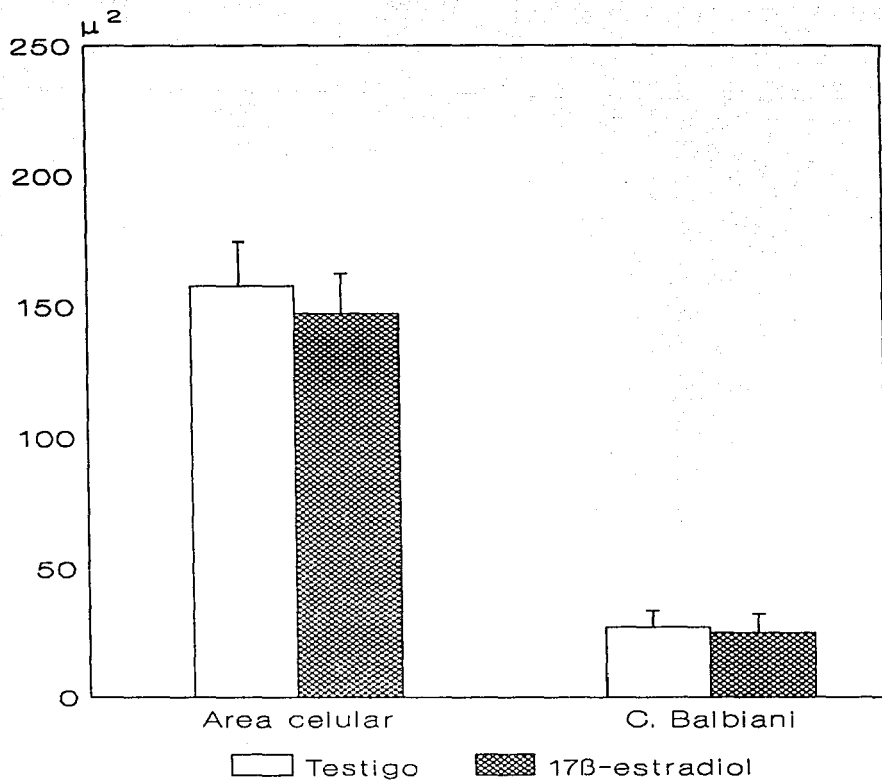


Figura 9.- El área celular promedio de los ovocitos y el tamaño del cuerpo de Balbiani no se modifica en los animales que recibieron 17β-estradiol a los 11, 13 y 15 días de desarrollo embrionario. Los valores representan la media ± error estandar medio, prueba de t de Student .

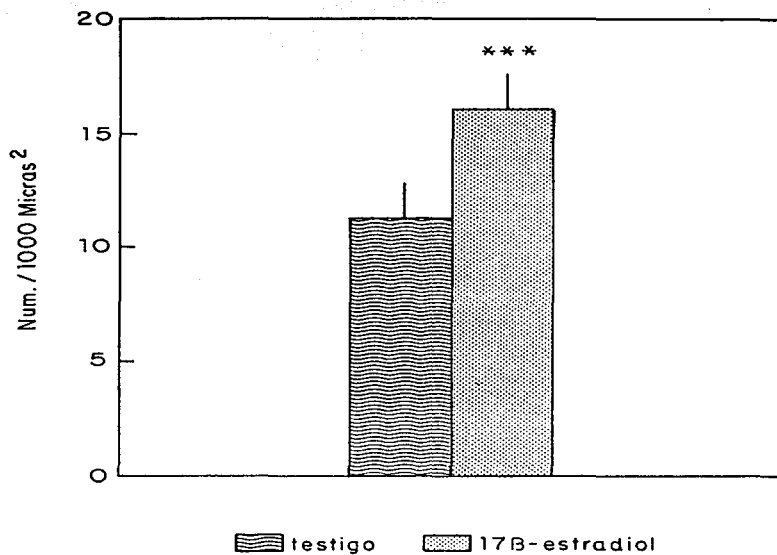


Figura 10.- El número de células indiferenciadas por unidad de área en la médula ovárica se incrementa por la administración de 200 ng de 17β-estradiol a los 11, 13 y 15 días de incubación. *** $P < 0.001$, prueba de t de Student .

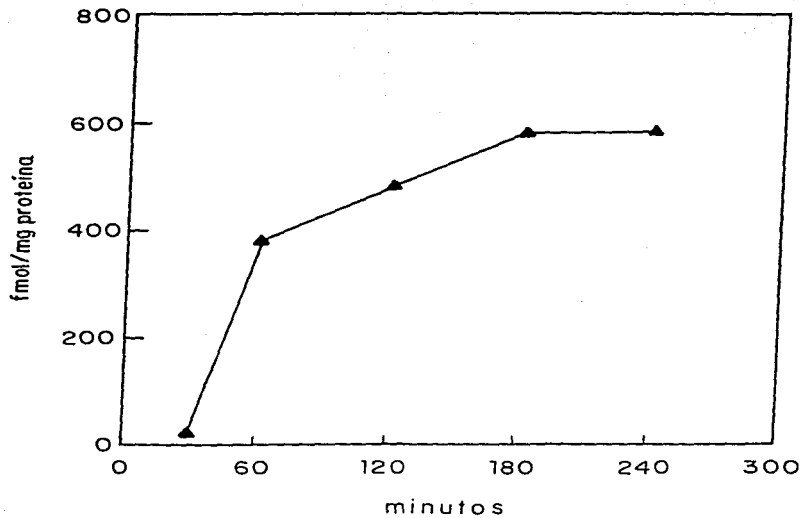
por las células íntegras, se obtiene durante los primeros 60 min y es hasta los 180 min de incubación cuando se observa la unión máxima (Fig. 11).

En una segunda prueba se comparó la unión específica de [^3H]17 β -estradiol a las 4 y 24 horas de incubación en las células íntegras con la captación del mismo esteroide en la fracción nuclear. En la Fig.12 se muestra que en las células íntegras, la unión de [^3H]17 β -estradiol es mayor que la observada en la fracción nuclear. La unión del [^3H]17 β -estradiol tanto para las células íntegras como para la fracción nuclear, es mejor si el tiempo de incubación es de 4 h.

Las pruebas de desplazamiento con 17 β -estradiol radioinerte (E_2), dietilstilbestrol (DES) y dehidrotosterona (DHT), indicaron que sólo los compuestos estrogénicos fueron capaces de competir por el sitio de unión del estradiol. Como se observa en la Fig. 13 el [^3H]17 β -estradiol fue desplazado más eficientemente por el DES y el E_2 , mientras que la DHT no produjo ningún efecto.

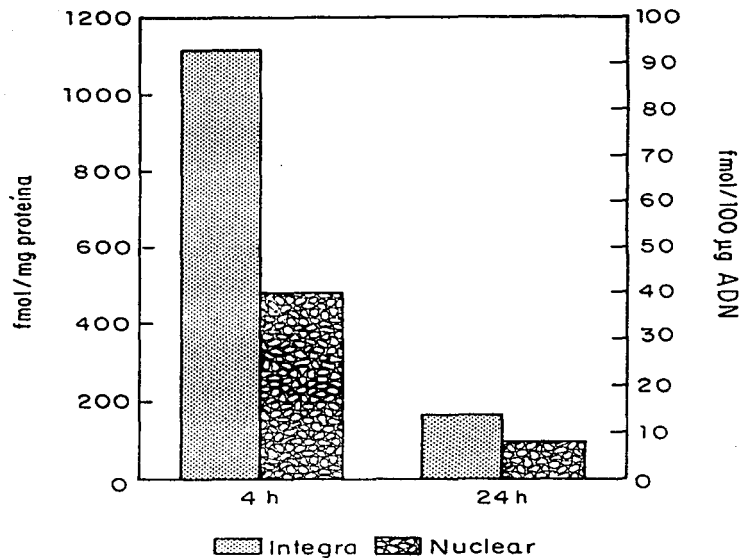
El coeficiente de sedimentación del complejo hormona-receptor fue evaluado por ultracentrifugación sobre gradientes lineales de sacarosa, a partir de la fracción citosólica de las células ováricas previamente incubadas con [^3H]17 β -estradiol y [^3H]tamoxifen aziridina. Con base en la localización de la albúmina, con un patrón de sedimentación conocida, la máxima unión del ligando apareció entre las fracciones 19-20 del gradiente cuya densidad corresponde al del coeficiente de sedimentación de 7-8 S (Fig. 14).

El receptor a estrógeno también tiene afinidad por el tamoxifen, por lo que se ensayó además la unión del [^3H]tamoxifen-aziridina, el cual se une covalentemente a éste. Al igual que con el [^3H]17 β -estradiol, la unión del receptor a



Temp. 4°C. E₂

Figura 11.- La captación de [³H]17β-estradiol, a 4°C, por células del ovario de pollo recién nacido se incrementa con el tiempo de incubación. El incremento más significativo en la captación del esteroide se observa durante los primeros 60 min. Estos resultados son representativos de una serie de experimentos.



Temp 4C, E₂

Figura 12.- Se ensayó la unión específica del [³H]17β-estradiol en células íntegras y fracción nuclear. La captación específica del esteroide por las células del ovario de pollo recién nacido es mayor si el tiempo de incubación es de 4 h. La suspensión celular se incubó con 2nM de [³H]17β-estradiol, por 4 y 24 h a 4°C. Estos resultados son representativos de una serie de experimentos.

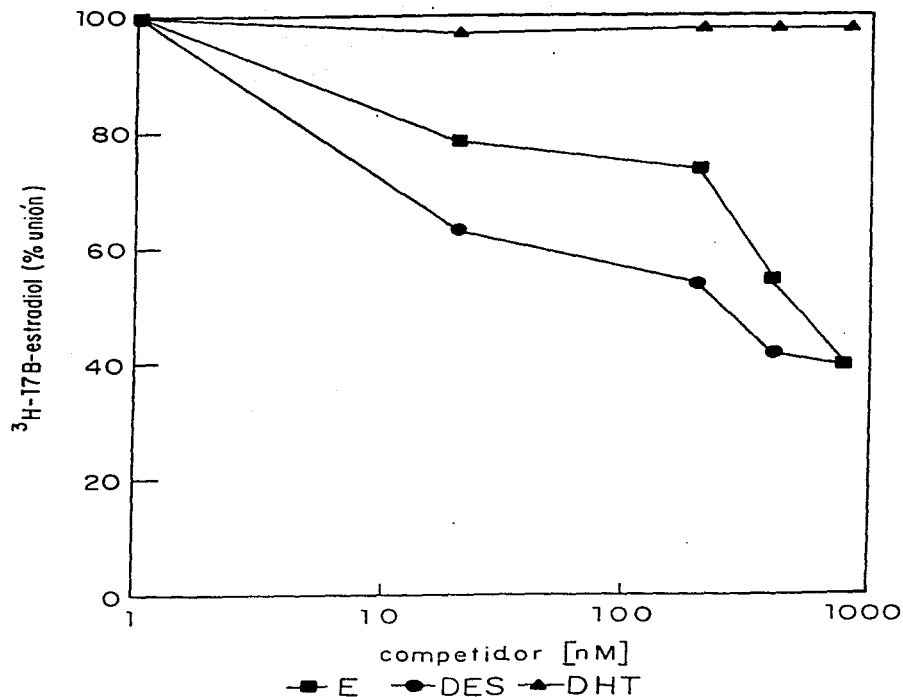


Figura. 13.- Unión específica de [³H]17β-estradiol en las células del ovario de la pollita recién nacida. La suspensión celular fue incubada a equilibrio con [³H]17β-estradiol (2 nM) por 1 hora a 4°C con y sin concentraciones crecientes de los siguientes competidores: 17β-estradiol (E₂), dietilstilbestrol (DES) y dihidrotestosterona (DHT). La unión total en ausencia del competidor se tomó como el 100%. Estos resultados son representativos de una serie de experimentos.

estrógeno con el [^3H]tamoxifen-aziridina se observó en las fracciones 19-20 del gradiente de sacarosa. El pico de radiactividad obtenido con este compuesto fue menor al obtenido con 17β -estradiol.

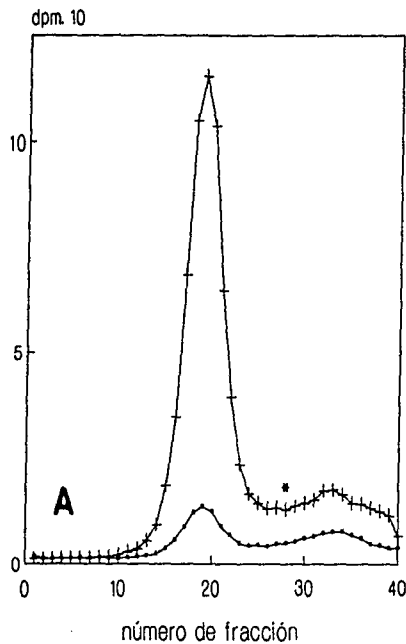
En en los dos casos mencionados, el citosol de las células de los oviductos de estos mismos animales fue usado como control positivo. El complejo hormona-receptor aparece en las fracciones 19-20 del gradiente de sacarosa para ambos compuestos, la marca radiactiva fue mayor para el [^3H]17 β -estradiol comparada con el [^3H] tamoxifen aziridina (Fig.14).

Unión de 17β -estradiol en Subpoblaciones Purificadas de Células Ováricas

Las subpoblaciones celulares purificadas a partir de células del ovario de pollo de un día de edad, (Fig.15) unieron específicamente el [^3H]17 β -estradiol. Así, se detectó la unión celular específica de el [^3H]17 β -estradiol en células esteroidogénicas típicas (F I), ovocitos primarios (F II), células pregranulosas y células epiteliales relativamente indiferenciadas (F III y IV). Las células esteroidogénicas típicas y los ovocitos (F I y F II) tienen mayor captación de [^3H]17 β -estradiol que las células de la fracciones III y IV (Fig. 16).

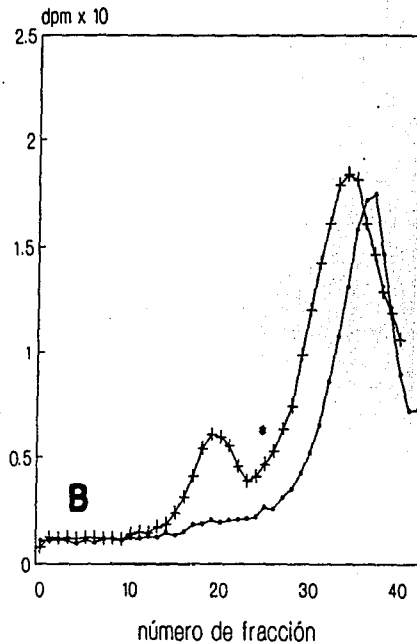
La unión específica [^3H]17 β -estradiol también se estudio en la fracción citosólica de las subpoblaciones de células ováricas antes mencionadas. La unión específica con [^3H]17 β -estradiol se registró en el citosol de los ovocitos primarios (F II), de las células pregranulosas y de las células epiteliales relativamente indiferenciadas (F III y IV) del ovario de pollo. En el citosol de las células esteroidogénicas típicas (F I) no se detectó unión específica (Fig.17).

Oviducto



— TamAz — + 17β-estradiol

Ovario



— TamAz — + 17β-estradiol

Figura 14.- Perfiles de sedimentación del gradiente de densidad del complejo hormona-receptor de estrógeno, en el citosol del ovario (A) y del oviducto (B) del pollo recién nacido. Alicuotas del citosol se marcaron *in vitro* con 5 nmol [3 H]17β-estradiol y con 1 ó 10 nmol [3 H]tamoxifen aziridina/ μ l. Se aplicaron 500 μ l de la fracción unida a gradientes de sacarosa del 15-35 % y se centrifugaron por 2.5 horas a 370,000 g. El * muestra la fracción en la cual sale la albúmina.

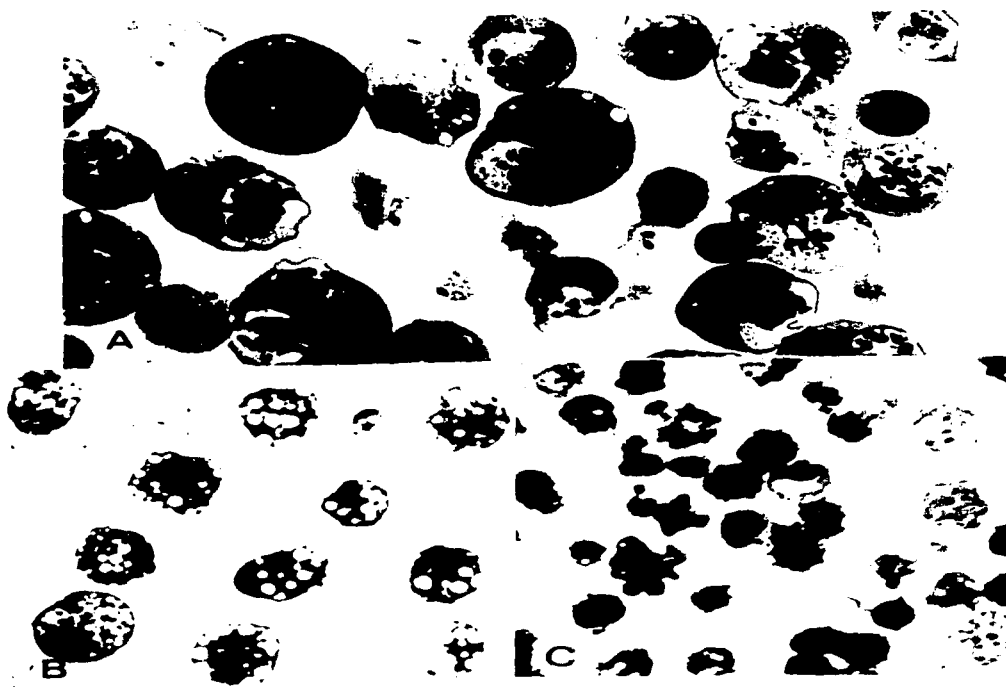


Figura 15.- La separación de las células ováricas por medio de un gradiente de densidad continuo de metrizamida (0-20 %), permite obtener subpoblaciones celulares con menos del 10% de contaminación de otros tipos celulares. Se observan a los ovocitos (A), células somáticas con abundantes inclusiones de lípidos (B) y células somáticas con pocas inclusiones de lípidos (C).

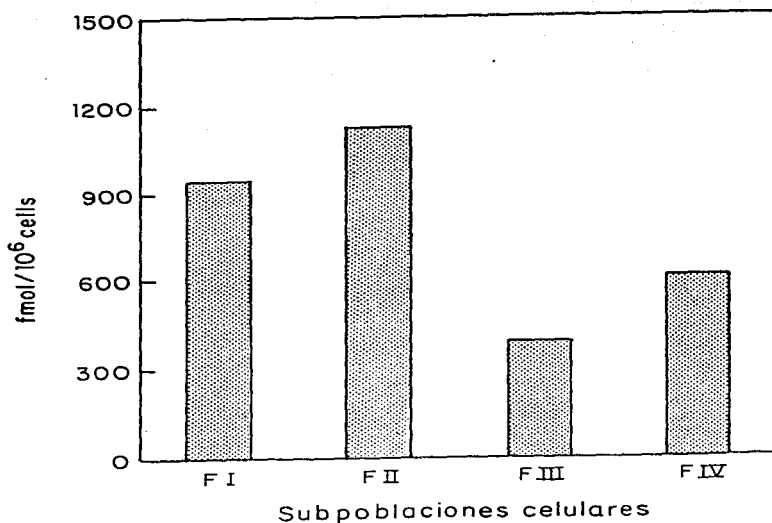


Figura 16.- Unión específica de [³H]17β-estradiol en diferentes subpoblaciones celulares purificadas del ovario de pollo recién nacido. Las células fueron separadas por medio de un gradiente de densidad continuo de metrizamida de 0-20%. Células esteroidogénicas típicas (F I), ovocitos primarios (F II), células pregranulosas y células epiteliales relativamente indiferenciadas (F III y IV). Estos resultados son representativos de una serie de experimentos.

En cambio, la unión nuclear de [^3H]17 β -estradiol se observó en las células esteroidogénicas típicas, los ovocitos primarios y en las fracciones III y IV e incluyen a las células pregranulosas y células epiteliales relativamente indiferenciadas (Fig. 18).

Como testigo positivo en los experimentos de captación específica de 17 β -estradiol para las fracciones nuclear y citosólica se usaron las células del oviducto de los mismos embriones (Figs. 17 y 18).

Inmunolocalización del Receptor a Estrógeno por Microscopía Electrónica

El estudio morfológico para localizar a nivel ultraestructural al receptor de estrógenos en el ovario de pollo de un día de edad, requiere de la identificación de los granos de oro coloidal en el núcleo y el citoplasma de las células ováricas estudiadas.

El proceso de fijación necesario para llevar a cabo la inmunolocalización del receptor es muy suave y no permite una buena conservación de la ultraestructura del tejido. Sin embargo, la preservación del tejido es aceptable y permite identificar los tipos celulares. En la corteza ovárica, los ovocitos se identificaron fácilmente por su tamaño y su núcleo en meiosis. Asimismo, la ubicación de las células pregranulosas rodeando a los ovocitos permitió identificarlas sin lugar a dudas. En el caso de la médula, las células esteroidogénicas típicas se distinguieron por la gran cantidad de inclusiones de lípidos en su citoplasma, así como por su agrupamiento en forma de cordones; las células epiteliales relativamente indiferenciadas se reconocen por su forma más alargada y su ubicación por fuera de los cordones de células esteroidogénicas.

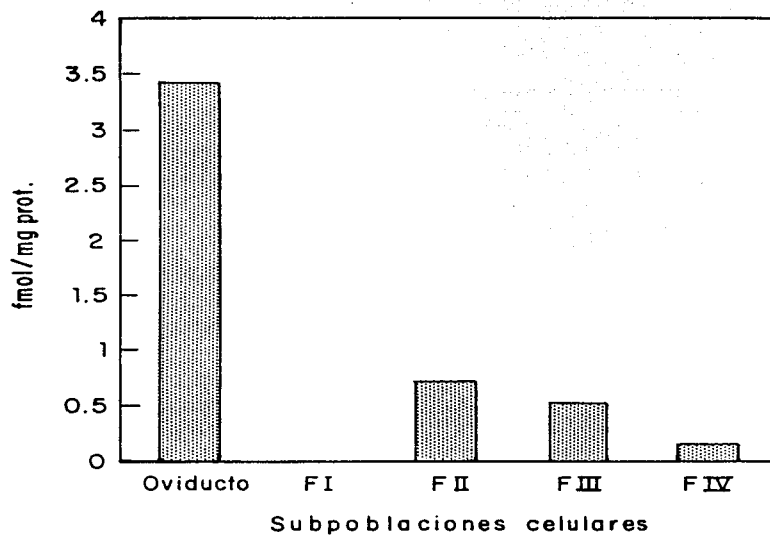
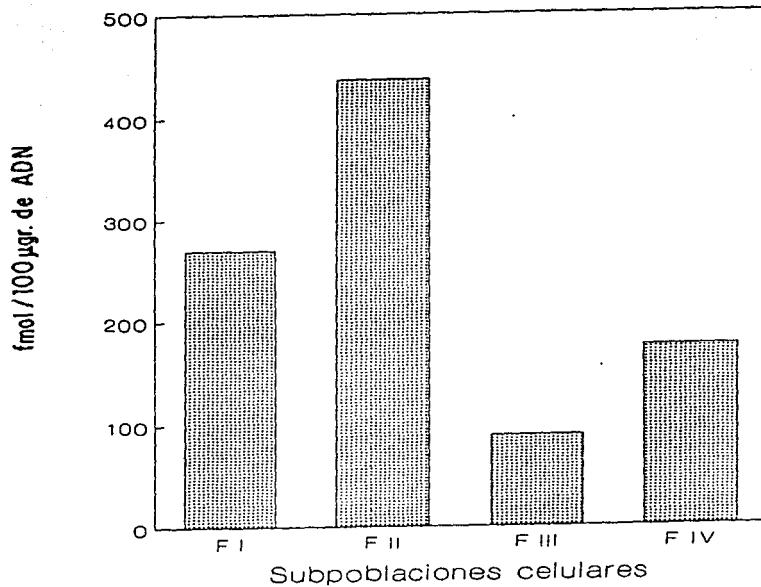


Figura 17.- Captación citosólica específica de $[^3\text{H}]17\beta$ -estradiol en subpoblaciones celulares purificadas del ovario de pollo recién nacido. Las subpoblaciones celulares corresponden a las descritas en el texto.



1h a 37 C

Figura 18.- Unión específica nuclear del [^3H]17 β -estradiol en ovocitos primarios (F II), células esteroidogénicas típicas (F I), células pregranulosas y en células epiteliales relativamente indiferenciadas (F III y F IV).

En el núcleo y en el citoplasma de las células antes mencionadas, se cuantificó el número de granos de oro por unidad de área. Los datos que están representados en la Tabla IV, corresponden a la cantidad de granos de oro por μm^2 , medidos en por lo menos 10 mediciones por tipo celular de dos animales por grupo experimental.

Tabla IV.- Inmunolocalización del receptor a 17β -estradiol en células del ovario de pollo recién nacido.

CORTEZA				
Tratamiento	Ovocitos		Células Pregranulosas	
	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma
Testigo	-----	-----	7.8 ± 1.3	2.8 ± 0.6
17β -estradiol	4.0 ± 2.1	2.3 ± 0.5	5.5 ± 4.6	3.5 ± 1.9
MÉDULA				
Tratamiento	C. Esteroidogénicas		C. Indiferenciadas	
	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma
Testigo	7.7 ± 4.5	3.5 ± 2.9	5.3 ± 2.1	1.9 ± 0.6
17β -estradiol	3.7 ± 1.4	0.7 ± 0.6	5.3 ± 3.1	1.8 ± 1.0

La tabla muestra el promedio del número de granos de oro/ $\mu\text{m}^2 \pm$ la desviación estandar de 10 mediciones en cada una de las células mencionadas .

En todos los casos se observa que hay mayor número de granos de oro en la zona del núcleo, comparada con la del citoplasma. El receptor a estrógenos, expresado como número de granos de oro por μm^2 , se encuentra en igual proporción en las células de los animales testigo y los tratados con 17β -estradiol. No

se realizaron análisis estadísticos que comparen los resultados entre las aves testigo y experimentales por el número de animales en cada grupo (dos casos por grupo). La Fig. 19 muestra el núcleo de un ovocito; se observan los granos de oro coloidal que evidencian la presencia del receptor a estrógeno.

Con el objeto de discriminar la ubicación de los granos de oro dentro de las estructuras nucleares, se compararon las imágenes obtenidas por contraste convencional, con acetato de uranilo y citrato de plomo con el cual se observan las fibras de cromatina como estructuras electrodensas y las obtenidas al tratar los cortes con ácido etilen diaminotrecético (EDTA) antes de darles un ligero contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. El tratamiento previo con EDTA revela las partículas ribonucleoproteicas y no se observan las fibras de cromatina.

Con el contraste convencional, los granos de oro se ubican generalmente sobre las fibras de cromatina, pero en el caso del contraste específico para las ribonucleoproteínas los granos de oro se localizan preferencialmente en los "espacios claros" que corresponderían a la fibras de cromatina y no están asociados a las mismas (Fig. 20).

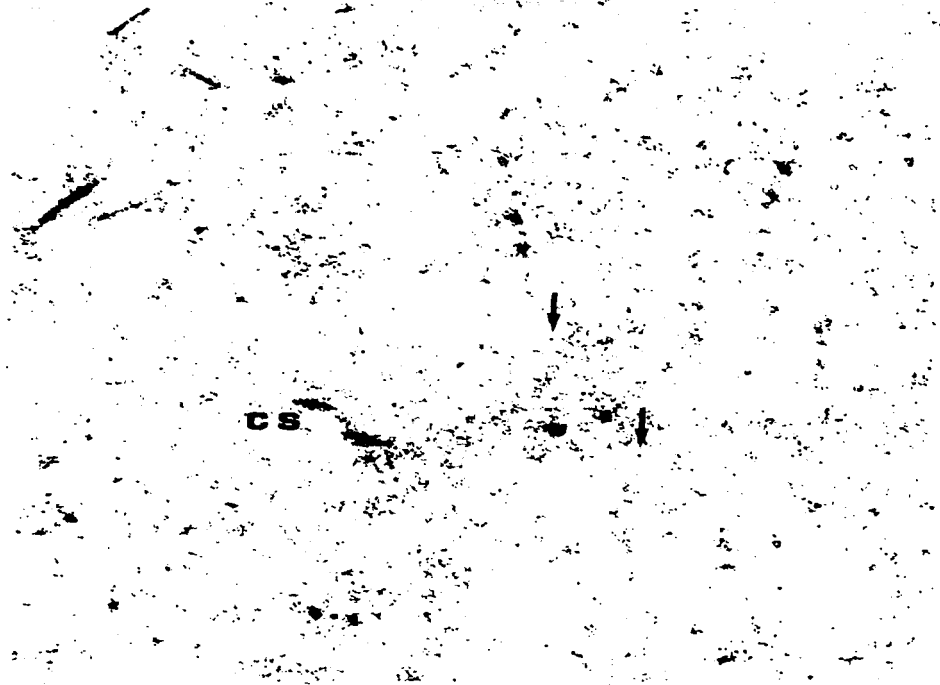


Figura 19.- En el núcleo de los ovocitos primarios se encontraron granos de oro que señalan la presencia del receptor a estrógeno (†). También se observan los complejos sinaptonémicos como estructuras más electrodensas (CS).

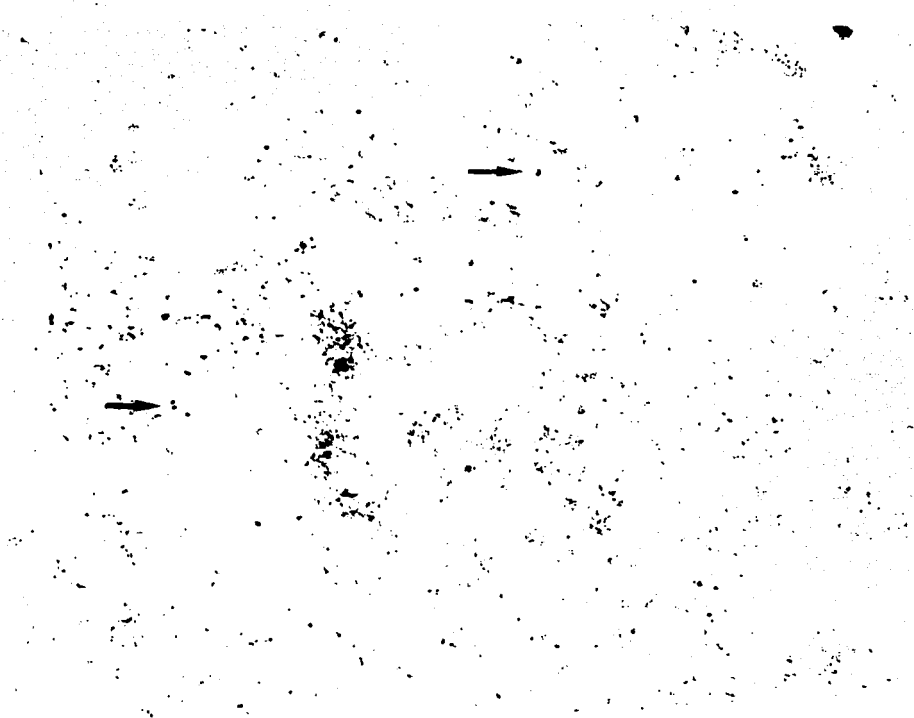


Figura 20.- La figura muestra parte del núcleo de un ovocito primario que ha sido tratado con EDTA antes del contraste plomo. Los granos de oro se localizan preferentemente en "espacios claros" que corresponden a las fibras de cromatina laxa (↑).

DISCUSION

Los resultados obtenidos proporcionan evidencias bioquímicas e inmunocitoquímicas de la presencia del receptor a estrógenos localizado preferentemente en el núcleo de los ovocitos y de las subpoblaciones de células somáticas estudiadas. Los mismos resultados permiten sugerir que este receptor también se encuentra en el citosol de las células antes mencionadas. La administración embrionaria de 17β -estradiol se tradujo en varios efectos biológicos sobre las células ováricas. La población de las células somáticas sin abundantes inclusiones de lípidos, resultó ser sensible al tratamiento hormonal. Dentro de esta población, aumenta el número relativo de las células epiteliales relativamente indiferenciadas de los cordones medulares, asimismo se incrementa el área celular promedio de las células pregranulosas. En el aspecto funcional, la secreción *in vitro* de 17β -estradiol por la suspensión de células ováricas se encuentra aumentada en los animales tratados con estrógenos.

Cuantificación de las Células Ováricas

La metodología utilizada para evaluar el número de células del ovario izquierdo requiere de la disección íntegra del órgano y posteriormente, su completa disociación hasta obtener una suspensión celular homogénea. Durante el procedimiento se trabajó con material de vidrio siliconizado con el objeto de reducir la adherencia de las células a las paredes. El número de células germinales del ovario observado en este trabajo, es similar al encontrado por Hughes (1963) en el ovario de embrión de pollo de la misma edad; este autor cuantificó las células germinales en cortes seriados de ovarios completos incluidos en parafina. Por otra parte, McCarrey y Abbott (1982) utilizaron una técnica similar para contar las células germinales durante el desarrollo temprano del embrión de pollo. La ventaja de este método es

que contando las células obtenidas por disociación enzimática del ovario, se puede estudiar un mayor número de animales experimentales que utilizando los cortes seriados de parafina.

La observación de la suspensión de células ováricas al microscopio óptico permite distinguir tres tipos celulares, representativos de las diversas subpoblaciones celulares. En la subpoblación de células germinales, se distingue a los ovocitos por su mayor tamaño, su núcleo excéntrico y la presencia del cuerpo de Balbiani en posición yuxtannuclear. Dentro de las células somáticas, las células esteroideogénicas típicas se identifican porque tienen gran cantidad de vacuolas lipídicas en su citoplasma (Alvárez-Fernández y col., 1995), característica que permite separarlas de la otra subpoblación de células sin inclusiones de lípidos. En esta última subpoblación, se incluyen varios tipos de células somáticas, como se describió en resultados. Con la metodología empleada se puede evaluar el número total de células por ovario, de dos subpoblaciones puras (ovocitos primarios y células esteroideogénicas típicas) y de una subpoblación mixta de células somáticas.

El número de células germinales en el ovario normal del embrión de pollo muestra que éstas aumentan gradualmente durante la incubación, y que el máximo número de las mismas se observa al día 17 de desarrollo. Este resultado confirma lo descrito anteriormente por Hughes (1963) quien contó a las células germinales en cortes histológicos del ovario izquierdo del embrión de pollo entre los 9 y 21 días de incubación. Ambos estudios coinciden además en que existe disminución de los ovocitos primarios después de que han llegado a su número máximo; al nacimiento se observa una reducción de aproximadamente el 30% de ovocitos con respecto al número encontrado en el día 17 de incubación. La reducción en el número de células

germinales que se observa en los últimos cuatro días de incubación, se debe al fenómeno de atresia que sufren las ovogonias y los ovocitos primarios, fenómeno observado también durante el desarrollo del ovario de mamíferos (Beaumont y Mandl, 1962; Baker, 1963; Ioannou, 1964). La atresia de las células germinales es un proceso general en los vertebrados que se ha descrito tanto en mamíferos como en no mamíferos. Suponiendo que dicho proceso estuviera regulado en las aves de una manera similar a la descrita en la rata, podría considerarse un efecto protector de los estrógenos sobre el proceso de atresia ya que se sabe que en ratas inmaduras hipofisectomizadas, los estrógenos disminuyen la atresia folicular (Goldenberg y col., 1972). Se ha descrito además que, el fenómeno de apoptosis celular puede ser inhibido por estrógenos y aumentado por andrógenos en el ovario de la rata adulta (Billig y col., 1993)

En el ovario de los embriones de pollo tratados con estrógenos, el número de células germinales durante la segunda mitad de la incubación, se comporta de manera similar al grupo testigo, es decir, se incrementa desde el día 13 de incubación llega al valor máximo al día 17 y después de esta fecha disminuye gradualmente hasta el día 21. En ninguna de las edades estudiadas se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, ni se pudo detectar alguna modificación sobre los ovocitos que nos permita inferir algún efecto biológico de los estrógenos, a pesar de que, como se discutirá más adelante, los resultados de la unión específica de estradiol radiomarcado y de la inmunolocalización del receptor a estrógenos, nos indica que al nacimiento estas células contienen receptores a estrógenos.

Con respecto a la población de células somáticas que componen el ovario del embrión de pollo (células pregranulosas, células esteroideogénicas típicas y células

epiteliales relativamente indiferenciadas de la médula), dentro de lo que he revisado no encontré datos en la literatura sobre cuál es su comportamiento durante el desarrollo del ovario inmaduro normal. Los resultados de este estudio muestran que la proliferación de ésta subpoblación en el ovario normal es más activa entre el día 13 y el día 15 de incubación. Además, las células somáticas del ovario en el embrión de pollo alcanzan su número máximo al día 17 de incubación y después de esta edad permanecen relativamente constantes hasta la eclosión.

En los animales que recibieron 17β -estradiol durante el desarrollo embrionario se observa la misma curva de incremento de las células somáticas hasta el día 17 de incubación, pero al nacimiento esta población tiene mayor número de células. El efecto proliferativo del 17β -estradiol es sólo sobre la población de células somáticas sin inclusiones de lípidos, posiblemente las células pregranulosas y las células epiteliales relativamente poco diferenciadas respondan a esta hormona (Méndez y col.,1993). Esto se propone por los resultados del estudio morfométrico que se discutirán más adelante.

Subfases de la Profase I de la Meiosis en los Ovocitos

En el ovario de pollo recién nacido los ovocitos primarios se encontraron principalmente en cigoteno, aunque también se observan ovocitos en paquiteno y en menor grado en leptoteno. Estos resultados difieren de los obtenidos por Hughes (1963), quien informa que un día después de la eclosión el mayor número de ovocitos está en paquiteno. Esta discrepancia en los resultados podría explicarse por diferencias en el tiempo en que se sacrifica a los animales, los resultados informados por Hughes son un día después de la eclosión, mientras que los de este estudio son en el día del nacimiento. También podría influir el hecho de que los estudios no se realizaron en animales de la misma raza; en este trabajo se emplearon pollos de la

raza White Leghorn, mientras que Hughes (1963) utilizó la primera generación de la cruce entre la raza White Leghorn y Rhode Island.

La administración embrionaria de estrógenos no cambió la proporción de ovocitos que se encuentran en leptoteno, cigoteno y paquíteno. Con base en estos resultados, los factores que controlan la profase I de la meiosis en los ovocitos no parecen depender de estrógenos. Esto concuerda con lo observado en los ovocitos de mamíferos, donde el medio ambiente hormonal no altera el transcurso de la profase I de la meiosis ni en ovocitos ni en espermatocitos (Steinberger, 1971; Blandau y Odor, 1972; Mauleon 1973; Challoner 1975). En este mismo sentido, Fugo (1940) observó en las aves, que las células germinales se desarrollaban normalmente en ausencia de gonadotropinas. Si el control de la meiosis es independiente de influencias hormonales, cabe la posibilidad que el paso de ovogonia a ovocito se regule por factores propios de éstas células, es decir que exista un reloj biológico interno que indique el momento en que las ovogonias dejen de dividirse por mitosis e inicien la meiosis. Sin embargo, como comentamos en la introducción, es muy reducida la información disponible sobre el control génico del inicio de la meiosis en los vertebrados. Algunos autores plantean que este proceso podría estar influenciado por otros factores locales ya que las primeras células que entran en meiosis son las de la parte central del ovario fetal (Byzkov y Hoyer, 1994).

Secreción de Hormonas Esteroides

El papel de la LH en el incremento de la esteroidogénesis ha sido revisado extensamente en las células de Leydig (Moger, 1991; Hall, 1994) y de la teca folicular (Bogovich y col., 1982). Además se sabe que los receptores a LH en las células granulosa del folículo preovulatorio pueden ser inducidos por hormonas esteroides y FSH (Richards, 1975). En este estudio observamos que las células

ováricas disociadas conservan su capacidad esteroidogénica y secretan 17β -estradiol al medio de cultivo. En condiciones basales, la cantidad de 17β -estradiol segregada al medio de incubación es igual en los pollos tratados con estrógenos comparados con los testigos. Ambos grupos responden al estímulo LH/hCG aumentando la secreción de 17β -estradiol. Esta respuesta a la estimulación por gonadotropinas hipofisarias, indica que la funcionalidad de los receptores a la hormona luteinizante no se altera por la disgregación enzimática del ovario y coincide con estudios de varios autores, en cuanto a que el ovario del embrión de pollo responde al estímulo LH/hCG (Cedard y col., 1968; Akram y Weniger, 1974; Teng y Teng, 1977; Guichard y col., 1979; Woods y col., 1981; Teng, 1982).

Los animales tratados con 17β -estradiol tienen mayor capacidad de respuesta al estímulo con hCG; las causas del aumento en la secreción de 17β -estradiol en los animales tratados podrían ser: a) un aumento relativo del número de células productoras de estrógenos; b) un aumento en la capacidad de respuesta al estímulo gonadotrópico por regulación hormonal del RNA mensajero para los receptores LH/hCG (Segaloff y col., 1990) y, c) una mayor capacidad de secreción por regulación hormonal de la expresión de enzimas como P450_{scc} y P450_{aro} (Toaff y col., 1983; Goldring y col., 1987; Fitzpatrick y Richards, 1991).

En relación a la primera posibilidad, el aumento de la secreción de 17β -estradiol podría explicarse al menos en parte, con los resultados obtenidos en el estudio morfológico ya que el tratamiento con 17β -estradiol aumentó el número relativo de células productoras de estrógenos. Éstas corresponden a las células

epiteliales relativamente indiferenciadas de la médula ovárica que han sido propuestas como productoras de estradiol (Pedemera y col., 1988).

La segunda explicación considera que en las células de los animales tratados con estrógenos, haya más receptores a la hormona luteinizante y por lo tanto el estímulo con hCG se amplifique en las células epiteliales relativamente indiferenciadas, lo que se traduciría en una mayor secreción de 17β -estradiol. Sin embargo, ésta hipótesis es poco probable ya que en otro tipo celular típicamente esteroideogénico como es la célula de Leydig, el número de receptores a LH presentes es mayor al que se necesita para producir la máxima actividad esteroideogénica (Dufau y col., 1978), tampoco se ha demostrado que en los folículos preovulatorios se encuentre aumentado el número de receptores a LH. Por otra parte, Richards, (1994) propone que las diferentes respuestas a FSH durante el desarrollo folicular, pueden deberse a que los receptores cambien su acoplamiento a las vías de señalización intracelulares conforme va madurando el folículo; en las células pregranulosas de los folículos preovulatorios es mayor la producción de AMP cíclico comparada con los folículos antrales pequeños, a pesar de que el número de receptores no varía. No se puede descartar que con la hormona luteinizante suceda un fenómeno parecido al reportado para la FSH. En este caso se debe considerar la posibilidad de que la exposición embrionaria al 17β -estradiol provoque que los receptores a LH se acoplen a mejor a los transductores de señal intracelulares y por lo tanto sea esa la causa de la amplificación de la respuesta esteroideogénica. Este hecho sería congruente con la hipótesis que propone la regulación hormonal de la proteína RII β durante el desarrollo folicular (Richards, 1994).

En ratas inmaduras hipofisectomizadas los estrógenos aumentan la expresión de las enzimas esteroideogénicas P450_{scc} y P450_{aro} (Fitzpatrick y Richards, 1991) con lo que aumenta la capacidad de aromatización de los andrógenos por las células productoras de estrógenos. Podría ser que el 17 β -estradiol actuara de una manera similar sobre las células productoras de estrógenos del ovario inmaduro del pollo. Para comprobar esta hipótesis se necesitaría realizar estudios de cinética enzimática.

En los animales que recibieron un tratamiento con 17 β -estradiol durante el desarrollo embrionario la generación de una mayor respuesta esteroideogénica a la hCG probablemente incluya a más de uno de los factores anteriormente mencionados.

Estudio Morfométrico

Actualmente se dispone de la tecnología necesaria para realizar mediciones morfométricas confiables sobre cortes histológicos, mediante el uso de programas de cómputo para la digitalización de imágenes. En nuestras mediciones esta herramienta fue de gran ayuda ya que, aunada a la heterogeneidad de la tinción con el azul de toluidina, hizo posible valorar las diferencias de tamaño de las células. Con base en estas características, se pudo medir en forma confiable el número de células por 1000 μ^2 de tejido, el área celular promedio de los ovocitos primarios y de las células pregranulosas en la corteza del ovario y de las células esteroideogénicas típicas de la médula ovárica.

El tratamiento con estradiol no modificó el número ni el área celular de los ovocitos que se encuentran en la corteza ovárica. En el citoplasma del ovocito se encuentra el cuerpo de Balbiani, éste es una acumulación de mitocondrias y

complejo de Golgi en relación con el centro celular, este organelo interviene en la síntesis de vitelo, la cuál a su vez es inducida por estrógenos en el animal adulto. Algún cambio morfométrico o morfológico en el cuerpo de Balbiani, podría indicar un efecto del 17β -estradiol a nivel de estos organelos citoplásmicos de los ovocitos. El análisis morfométrico muestra que esta estructura no se modifica por la exposición embrionaria al 17β -estradiol. Estos resultados, sumados a la falta de modificaciones en las subfases de la meiosis, indican que con este esquema de tratamiento, el 17β -estradiol no parece tener efecto sobre los ovocitos, a pesar de que como se discutirá posteriormente, se ha demostrado que al nacimiento éstas células tienen receptor a estrógeno, lo que coincide con Wu y col., (1992, 1993) quienes informaron la presencia del RNA mensajero para el receptor de estrógeno en ovocitos humanos y de ratón. Sin embargo podría ser que, como en otros tejidos blanco de los estrógenos, la expresión del gen que codifica para el mismo esté limitada a pequeños intervalos durante el desarrollo.

La células pregranulosas son las células que están en relación directa con el ovocito y sus funciones en el ovario embrionario han sido poco estudiadas. Sin embargo es posible compararlas con las células granulosas del folículo ovárico porque son las células precursoras de la capa granulosa y mantienen una relación muy estrecha con el ovocito durante toda la vida reproductiva del animal. En las células de la capa granulosa del folículo ovárico de mamíferos, está ampliamente demostrado que los estrógenos estimulan su propia síntesis, por una acción directa sobre las células pregranulosas; además, el 17β -estradiol ejerce un efecto proliferativo sobre las mismas (Rao y col., 1978), estimula la respuesta celular a la FSH y aumenta la actividad del complejo enzimático P450_{sc}, así como su

contenido mitocondrial (Toaff, 1983; Veldhuis 1985) e induce la expresión de genes regulados por FSH, como son los genes para la aromatasas, el receptor a LH y la RII β , entre otros (Richards, 1980; 1994). En el útero, la exposición a estradiol durante la fase proliferativa del ciclo, incrementa el número de receptores a progesterona y al mismo estradiol (Robel y col., 1978). Los resultados del presente estudio indican que en el ovario del embrión de pollo, las células pregranulosas son sensibles al tratamiento hormonal y responden al estradiol con una marcada hipertrofia de su citoplasma. Es necesario realizar más estudios para encontrar el significado funcional de los cambios producidos por el 17 β -estradiol en las células pregranulosas de la corteza del ovario embrionario.

En la médula del ovario del embrión de pollo se encuentran islotes de células esteroideogénicas típicas que al nacimiento llegan a ocupar el 18% del área total del compartimiento medular (González Morán y col., 1985). Estas células responden al estímulo con hCG (González del Pliego y col., 1988) y son células productoras de andrógenos (Pedernera y col., 1988). En las aves, por sus características funcionales y según los estudios que describen ultraestructuralmente su desarrollo postnatal (González del Pliego, 1991), estas células son las precursoras de las células intersticiales del ovario maduro en las aves. En los mamíferos a estas células se les describe como células intersticiales de tipo I (Erickson, 1985). Aún cuando estas células expresan al nacimiento el receptor a estrógeno, en los animales tratados con 17 β -estradiol no se observaron cambios morfológicos ni numéricos de las mismas. En la literatura revisada no encontré datos referentes al efecto del 17 β -estradiol sobre esta población celular en el ovario adulto.

Las células epiteliales relativamente indiferenciadas son el componente celular más abundante del compartimiento medular del ovario inmaduro del pollo. Esta población se define como epitelial por estar formando cordones, presentar uniones celulares de tipo desmosoma y tipo nexó, además de que se encuentran limitadas por una membrana basal (González del Pliego y col., 1991). Estas células representan la persistencia de los cordones sexuales en la región medular y mantienen características morfológicas de poca diferenciación. En el ovario de pollo recién nacido han sido propuestas como células productoras de estrógenos por su capacidad de aromatizar androstendiona y testosterona (Pedrera y col., 1989; Álvarez-Fernández y col., 1995). En la etapa postnatal se las encuentra rodeando los folículos primarios y secundarios (González del Pliego, 1991) y en el folículo maduro se las identifica formando los islotes de células epiteliales poco diferenciadas que se encuentran formando la teca externa. Hay evidencias que indican que estas células tienen actividad de aromataza y son productoras de estrógenos (Porter y col., 1989; Pedrera y col., 1989; Velázquez y col., 1991; Nitta y col., 1993; Hernández Vértiz y col., 1993). Los resultados de este estudio muestran que la estimulación con 17β -estradiol, el número de estas células aumenta en el parénquima medular. Este resultado coincide con el hecho de que el 17β -estradiol producido durante la incubación de la suspensión de las células ováricas, está aumentado en los ovarios de los animales tratados con estrógenos a los 11, 13 y 15 días de desarrollo embrionario. Este aumento en la producción de estrógenos coincide con lo observado en el ovario adulto de mamíferos, en el cuál se observa que el 17β -estradiol tiene una regulación positiva sobre su propia secreción (Engels y col., 1968; Zhuang y col., 1982).

Receptor a Estrógeno

Como es conocido, las hormonas esteroides actúan en sus tejidos blanco mediante la interacción de la hormona con su receptor, por lo que sólo pueden tener efecto directo en las células que lo expresan. La molécula del receptor a estrógenos se define por su alta afinidad a su ligando, porque el número de sitios que tiene la célula blanco para unirse a la hormona es saturable y por la especificidad que muestra la unión de la hormona con su receptor.

El receptor a estrógenos es una proteína que fácilmente se degrada cuando se maneja en el laboratorio; para protegerla de dicha degradación se emplea una solución amortiguadora adicionada con dos inhibidores de proteasas y molibdato de sodio para estabilizar al receptor de estrógeno durante la homogenización, según lo descrito por Noma y col. (1980), Madhok y col. (1987). El coeficiente de sedimentación del receptor a estrógeno se calculó en la fracción citosólica de las células ováricas y concuerda con el patrón característico de sedimentación 7-8 S encontrado por otros autores en el oviducto de rata (en: Robel y col., 1978). Es necesario destacar que el receptor a estrógeno de las células ováricas tiene el mismo coeficiente de sedimentación que el del oviducto.

En ambos tejidos la afinidad por el [^3H]17 β -estradiol fue mayor que para el [^3H]tamoxifen aziridina. La poca unión que exhibe el [^3H]tamoxifen aziridina con el receptor a estrógeno en nuestro modelo, contrasta con la del receptor de estrógeno de mamíferos, donde la unión covalente del [^3H]tamoxifen aziridina, por impedir la disociación del ligando con su receptor remarca la presencia del receptor a estrógeno. Este hallazgo pueden deberse a la diferencia interespecie.

Una evidencia sobre la especificidad del receptor a estrógeno presente en las células ováricas del pollo recién nacido, se obtuvo por la ineficacia de los compuestos no estrogénicos para desplazar al [^3H]17 β -estradiol del complejo hormona-receptor, comparada con el desplazamiento obtenido por 17 β -estradiol y dietilestilbestrol. El desplazamiento del [^3H]17 β -estradiol obtenido con DES en el ovario, no es tan efectivo como el que se logra en el oviducto (Méndez y col., 1994). En el presente ensayo con la dosis más alta de DES la unión del esteroide remanente es de 30% cuando la esperada sería de apenas un 10%. Esta diferencia es explicable, ya que el tejido ovárico es productor de estrógenos y debe considerarse el estradiol endógeno, que se está produciendo en estas condiciones de experimentación.

Es ampliamente reconocido que el 17 β -estradiol difunde fácilmente al interior de las células, sin embargo sólo es retenido en las células que presentan receptores específicos para el mismo. En este estudio se muestra que en el ovario de pollo recién nacido las células que lo integran tienen receptores para estrógenos ya que captan específicamente [^3H]17 β -estradiol. Cuando se purificaron subpoblaciones de células ováricas, se encontró que el receptor a estrógenos está presente en las células íntegras de las cuatro subpoblaciones estudiadas (ovocitos primarios, células esteroideogénicas típicas, células pregranulosas y células relativamente indiferenciadas de la médula). En la fracción citosólica de la subpoblación de células esteroideogénicas típicas no se observó la unión específica del [^3H]17 β -estradiol. Este resultado podría explicarse por el bajo número de células de ésta subpoblación (1-2 millones de células) que quedan después del proceso de purificación. Este resultado no puede interpretarse como la falta de

receptor en las células esteroideogénicas ya que en células íntegras, en la fracción nuclear y en la inmunolocalización se muestra la presencia del receptor a estrógeno en este tipo celular.

La unión específica del [³H]17β-estradiol al núcleo de las células ováricas muestra la existencia de receptores nucleares para esta hormona. Como se ha descrito en la literatura, los receptores a estrógenos en aves y mamíferos se encuentran en los tejidos involucrados en la reproducción y su localización es preferentemente nuclear (Richards, 1975; Yamamoto y col., 1976), aunque también se encuentran en el citosol. De la localización citosólica del receptor se discute si es un artefacto de las técnicas empleadas, es decir, que durante el procedimiento de extracción o corte del tejido este salga del compartimiento nuclear. Lo que está bien documentado es su intervención en la regulación de la transcripción génica, para cual necesariamente debe estar en el núcleo.

En el estudio inmunocitoquímico se usó un anticuerpo policlonal desarrollado contra una secuencia de aminoácidos específica del dominio de unión al ADN del receptor a estrógeno humano (anti-RE), la cual tiene 100 % de homología comparada con la del receptor a estrógeno de pollo (Green, 1987) y permite que haya reacción cruzada entre los receptores de ambas especies. Se muestra que el receptor a estrógeno está preferentemente en el núcleo de los ovocitos primarios y las células somáticas ováricas, aunque también se observa en menor cantidad en el citoplasma .

Los dos contrastes realizados en el tejido permiten sugerir que el receptor a estrógeno está asociado a las fibras de cromatina del núcleo de los ovocitos en paquiteno más que a las ribonucleoproteínas. Este hecho difiere de lo observado en

las células uterinas de la rata adulta donde la localización del receptor a estrógeno también es predominantemente nuclear pero está asociada preferencialmente a ribonucleoproteínas (Vázquez-Nin y col.,1991). Esta discrepancia podría deberse a que son modelos de estudio en diferente especie, estado de desarrollo y tipo celular.

La asociación del receptor a la cromatina coincide con el hecho de que existen secuencias específicas de ADN (elementos de respuesta a estrógenos) que son reconocidas por el complejo hormona- receptor de estrógeno.

Los resultados obtenidos mediante la unión específica de [³H]17β-estradiol, las pruebas de desplazamiento de estradiol radiomarcado, así como la inmunolocalización ultraestructural del receptor de estrógenos mediante anticuerpos muestra que en las células germinales y en las células somáticas del ovario de pollo recién nacido existe una proteína de 7-8 S que une en forma específica al 17β-estradiol y que su localización es preferentemente nuclear. Esto indica la presencia del receptor a estrógeno en todas las células somáticas ováricas y en los ovocitos primarios tanto por su caracterización bioquímica como por su inmunolocalización.

Los resultados obtenidos en las células pregranulosas y las epiteliales poco diferenciadas pueden explicarse porque la acción de los estrógenos estuvo mediada por la unión de la hormona con su receptor. Por otra parte, en los ovocitos primarios encontramos receptor a estrógeno, sin tener evidencias de un efecto biológico. Durante el desarrollo embrionario sólo las células que expresen el receptor de estrógeno serían susceptibles a estas hormonas, sin embargo, la expresión del receptor no es continua durante el desarrollo embrionario. Con base en lo antes mencionado, podría pensarse que a la edad en la que se administró el 17β-estradiol

(entre los 11 y los 15 días de incubación) en los ovocitos del embrión de pollo no se encuentra el receptor a estrógeno y por ello no se detectaron modificaciones en los mismos. Esta expresión temporal del receptor a estrógeno sería parecida a la que se observa en las células del mesénquima del tracto reproductivo del feto de ratón, las cuales expresan el receptor a estrógeno entre los 16-17 días de gestación (Greco y col., 1991) y concuerda además, con el hecho de que la administración de estrógenos en etapa de gónada indiferente aumenta el área celular promedio de los ovocitos en el ovario del embrión de pollo de 17 días de incubación (Cáceres, 1995). Por lo antes mencionado no se puede descartar totalmente un efecto del 17 β -estradiol sobre la progenie de las células germinales.

El papel de los estrógenos durante el desarrollo embrionario de las aves y los mamíferos requerirá de más estudios, sin embargo la secreción de estrógenos y la expresión del receptor a estrógeno durante el desarrollo, permite sugerir una participación importante de estas hormonas durante la etapa prenatal. Las evidencias presentadas en este estudio demuestran un efecto biológico de estas hormonas en por lo menos dos poblaciones de células somáticas del ovario del embrión de pollo.

CONCLUSIONES

- 1.- Las células germinales alcanzan su número máximo al día 17 de incubación y éste se reduce el día de la eclosión. El tratamiento con 17β -estradiol no modifica el número de células germinales en ninguna de las edades estudiadas.
- 2.- El número de células somáticas llega a su número máximo al día 17 de incubación y se mantiene estable hasta la eclosión. El tratamiento con 17β -estradiol hace que las células somáticas ováricas continúen aumentando de número hacia la eclosión.
- 3.- Los ovocitos primarios del grupo tratado con 17β -estradiol no presentan cambios significativos en el tamaño celular ni en el tamaño del cuerpo de Balbiani. Las etapas de la meiosis tampoco están modificadas en estas células.
- 4.- Las células somáticas modificadas por el 17β -estradiol son las células pregranulosas de la corteza ovárica las cuales están hipertrofiadas y las células epiteliales poco diferenciadas de la médula ovárica que aumentan su número. Las células productoras de andrógenos (esteroidogénicas típicas) no sufren cambios.
- 5.- La producción *in vitro* de estrógenos está aumentada en el ovario de las aves pretratadas con 17β -estradiol. Este fenómeno es evidente cuando las células ováricas son estimuladas con gonadotropina coriónica.
- 6.- La unión específica del 17β -estradiol en las células del ovario de pollo, es evidente y se detectó una proteína citosólica con coeficiente de sedimentación (7-8 S) que corresponde al receptor de estrógenos.
- 7.- En las subpoblaciones de células ováricas (ovocitos primarios, esteroidogénicas típicas, somáticas indiferenciadas y pregranulosas) se observa unión específica de 17β -estradiol, evaluada como captación celular, captación en la fracción nuclear y en la fracción citosólica.

8.- La inmunolocalización del receptor a estrógeno permite identificarlo principalmente en el núcleo de las cuatro subpoblaciones celulares mencionadas en el punto anterior.

CONCLUSION FINAL

El ovario del embrión de pollo sintetiza estrógenos desde los 7 días de desarrollo embrionario; el inicio de esta secreción coincide con su diferenciación morfológica y se mantiene hasta la eclosión del animal. En el presente estudio se muestra que además de los efectos del 17β -estradiol descritos en oviducto, esta hormona actúa sobre las subpoblaciones de células somáticas del ovario inmaduro de pollo. El 17β -estradiol estimula la proliferación de las células epiteliales poco diferenciadas que se encuentran formando cordones en la región medular del ovario, además induce la hipertrofia de las células pregranulosas de la corteza ovárica; desde el punto de vista funcional el 17β -estradiol incrementa la capacidad respuesta al estímulo LH/hCG sobre la secreción de estrógenos ováricos. Estos resultados permiten sugerir que el 17β -estradiol participa en la proliferación y el funcionamiento de por lo menos dos subpoblaciones de células somáticas del ovario del embrión de pollo. Con respecto a las células de la línea germinal, no se observó modificación alguna ni en la proliferación celular ni en el progreso de la meiosis en los ovocitos primarios.

Los estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos proporcionan evidencias de la presencia del receptor a estrógeno en las células somáticas y los ovocitos primarios en el ovario de pollo recién nacido, esto permite sugerir que el mecanismo de acción de los estrógenos está mediada a través de un receptor.

Con base en los resultados anteriormente descritos, es posible proponer que el 17β -estradiol secretado por la gónada femenina, es importante para la organogénesis normal del ovario de las aves.

PERSPECTIVAS

La participación del 17β -estradiol durante el desarrollo del ovario, nos lleva a considerar la importancia de la síntesis temprana de esta hormona sobre su propio órgano productor. Esto abre varias interrogantes, una de ellas está en relación a la aparición del receptor a estrógeno durante el desarrollo gonadal, es decir, si el mismo aparece desde la etapa de cresta genital o bien de gónada indiferente y si además se expresa en todos los tipos celulares involucrados en la conformación de la gónada. Sería interesante conocer el efecto del 17β -estradiol cuando se lo administra antes de la diferenciación ovárica, a fin de delucidar un posible efecto sobre las células de la línea germinal previo al inicio de la meiosis y confirmar además sus efectos sobre las células somáticas.

Otro aspecto de interés es la participación de las gonadotropinas durante el desarrollo ovárico; se sabe que la hormona estimulante del folículo interviene en la regulación de la secreción de 17β -estradiol por el ovario en el embrión de pollo, pero se desconoce su participación en la proliferación celular durante la etapa prenatal.

En el desarrollo del ovario participan numerosos factores, sería importante considerar la acción parácrina de los estrógenos, de los factores de crecimiento y de la participación de la inervación, en la morfogénesis gonadal.

Actualmente se pueden obtener animales en los cuales se ha bloqueado con la técnica de "knock out" el gen que codifica para el receptor a estrógeno; esto permitirá abordar el papel de los estrógenos en el desarrollo del aparato reproductor de los mamíferos.

BIBLIOGRAFIA

- Akram H, Weniger JP (1974) L' hypophyse est sans influence sur la synthèse d' oestrogenes chez l' embryon de poulet. *C R Acad Sci D (Paris)* **278**: 2669-2670.
- Alvarez-Fernández G, Juárez-Oropeza MA, Velázquez P, González del Pliego M, Méndez Herrera MC, Pedernera E (1995) Newly hatched chick ovarian cellsubpopulations metabolize distintively progestin and androgen precursors. *Gen Comp Endocrinol* **97**: 31-41.
- Attal J (1969) Levels of testosterone, androstenedione, estrone, and estradiol 17β in the testes of fetal sheep. *Endocrinology* **85**: 280-289.
- Austin J, Kimble J (1987) *glp1* is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*. *Cell* **51**:589-599.
- Baker TG (1963) A quantitative and cytological study of the germ cells in human ovaries. *Proc R Soc London Ser B* **158**:417-433.
- Beaumont HM, Mandl AM (1962) A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proc R Soc London Ser B* **155**:557-579.
- Beekman JM, Allan GF, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1993) Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain. *Mol Endocrinol* **7**:1266-1274.
- Billig H, Furuta Y, Hsueh AJ (1993) Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* **133**:2204-12.
- Blandau RJ, Odor DL (1972) Observations on the behavior of oogonia and oocytes in tissue and organ culture. En: Oogenesis. Biggers JD, Schuetz AW (eds). University park press, Baltimore, 301-320.

- Bogovich K, Richards JS (1982) Androgen biosynthesis in developing ovarian follicles: evidence that luteinizing hormone regulates thecal 17α hidroxilase and C_{17-20} lyase activities. *Endocrinology* **111**:1201-1208.
- Bradbury JT (1961) Direct action of estrogen on the ovary of the immature rat. *Endocrinology* **68**:115-120.
- Byskov AG, Hoyer PE (1994) Embriology of mammalian gonads and ducts. En: *The Physiology of Reproduction*. Second Edition, Knobil E y Neill (eds.). Raven, New York, 487-540.
- Cáceres Peralta L (1995) Modificaciones en las poblaciones celulares del ovario del embrión de pollo (*Gallus domesticus*) por la administración temprana de 17β -estradiol. Tesis de licenciatura en Biología. UNAM.
- Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW (1990) Steroid receptor family: Structure and Functions. *Endocr Rev* **11**:201-220.
- Challoner S (1975) Studies of oogenesis and follicular development in the golden hamster. 2. Initiation and control of the meiosis *in vitro*. *J Anat* **119**: 149-156.
- Cedard L y Haffen K (1966) Transformation de la déhydroépiandrosterone par les gonades embryonnaires de poulet cultivées "in vitro". *CR Acad Sci Paris D* **263**:430-433.
- Cedard L, Haffen K, Guichard A (1968) Influence de l' hormone gonadotrope chorionique sur la production d' oestrogènes à partir d' acetate de Na et de déhydroépiandrosterone radioactifs par les gonades embryonnaires de poulet, cultivées *in vitro*. *CR Acad Sci Ser D* **267**: 118-120.
- Clark JH y Markaverich BM (1988) Actions of ovarian steroid hormones. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E y Neill (eds.). Raven, New York, 675-724.
- Dayani N, McNaught RW, Schenolikar S, Smith RG (1990) Receptor interconversion model of hormone action. 2. Requirement of both kinase and phosphatase activities for conferring estrogen binding activity to the estrogen receptor. *Biochemistry* **29**:2691-2698.

- Dufau ML, Horner KA, Hayashi K, Tsuruhara T, Conn PM, Catt KJ.(1978) Actions of cholera toxin and gonadotropin in isolated Leydig cells. *J Biol Chem* **253**:3721-3729.
- Evans EP, Brekon G, Ford CE (1964) An air-drying method for meiotic preparation from mammalian testis. *Cytogenetics* **3**:289-294.
- Eicher EM, Washburn LL (1986) Genetic control of primary sex determination in mice. *Annu Rev Genet* **20**:327-360.
- Elbrecht A, Smith RG (1992) Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* **21**:77-83.
- Engels JA, Friedlander RL, Eik-Nes KB (1968) An effect of clomiphene on the rate of conversion of androstenedione C¹⁴, estrone C¹⁴ and estradiol C¹⁴ by the canine ovary. *Metabolism* **17**: 189-198.
- Erickson GF (1985) The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr Rev* **6**(3): 371-399.
- Erickson RP (1990) Post-meiotic gene expression. *TIG* **6**: 264-268.
- Fitzpatrick SL, Richards JS (1991) Regulation of cytochrome P₄₅₀ aromatase messenger RNA and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. *Endocrinology* **129**:1452-1462.
- Fugo NW (1940) Effects of the hypohysectomy in the chick embryo. *J Exp Zool* **85**:271-297.
- Galli FE, Wasserman GF (1973) Steroid biosynthesis by gonads of 7-and 10-day-old chick embryos. *Gen Comp Endocrinol* **21**:77-88.
- Gasc JM (1980) Estrogen target cells in gonads of the chicken embryo during sexual differentiation. *J Embryol Exp Morph* **55**:331-342.
- Gasc JM, Sar M (1981) Appearance of LH-immunoreactive cells in the Rathke's pouch of the chicken embryo. *Differentiation* **20**: 77-80
- George FW, Wilson JD (1978) Conversion of androgen to estrogen by the human fetal ovary. *J Clin Endocrinol Metab* **47**:550-555.

- George FW, Wilson JD (1988) Sex determination and differentiation. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E y Neill (eds.). Raven Press, New York, 3-23.
- George FW, Milewich L, Wilson JD (1978) Oestrogen content of the embryonic rabbit ovary. *Nature* 274:172-173.
- Gilbert SF, (1994) Sex determination. En: *Developmental Biology*. 4a. Ed. Sinauer Associates Inc Publishers, Sunderland, Massachusetts, 754-827.
- Ginsburg M, Snow MH, Mc Laren A (1990) Primordial and germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 113:521-528.
- Godin Y, Wylie C, Heasman J (1990) Genital ridges exert long-range effects on primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development* 108:357-363.
- Goldenberg RL, Vaitukaitis JL, Ross GT (1972) Estrogen and follicle stimulating hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology* 90:1492-1498.
- Goldring NB, Durica JM, Lifka J, Hedin L, Ratoosh SL, Miller WL, Orly J (1987) Hormonal regulation of cholesterol side-chain cleavage P₄₅₀ messenger in rat ovarian follicles and constitutive expression in corpora lutea. *Endocrinology* 120: 1942-1950.
- Gondos B (1978) Oogonias and oocytes in mammals. En: *The Vertebrate Ovary. Comparative Biology and Evolution*. Jones RE (ed.) Plenum Press, New York, 378.
- Gondos B, George FW, Wilson JD (1983) Granulosa cell differentiation and estrogen synthesis in the fetal rabbit ovary. *Biol Reprod* 29:791-798.
- González CB, Charreau EH, Aragonés A, Lantos CP y Follet BK (1987) The ontogenesis of reproductive hormones in the female embryo of the domestic fowl. *Gen Comp Endocrinol* 68:369-374.
- González del Pliego M, Gonzáles-Morán G y Pedernera E (1988) Ultrastructure of the ovarian medulla in the newly hatched chick treated with human chorionic gonadotropin. *Cell Tissue Res* 253:665-670.

- González del Pliego M (1991) Estudio Ultraestructural de las poblaciones esteroidogénicas durante el desarrollo de las aves. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, UNAM.
- González Morán G, González del Pliego M, Pedernera E (1985) Morphological changes in the ovary of newly hatched chickens treated with chorionic gonadotropin during embryonic development. *Gen Comp Endocrinol* **59**:162-167.
- Greco TL, Furlow JD, Duello TM Gorski J (1991) Immunodetection of estrogen receptors in fetal and neonatal female mouse reproductive tracts. *Endocrinology* **129**:1326-1332.
- Greco TL, Duello TM, Gorski J (1993) Estrogen receptors, estradiol, and diethylstilbestrol in early development: the mouse as a model for the study of estrogen receptors and estrogen sensitivity in embryonic development of male and female reproductive tracts. *Endocr Rev* **14**:59-71.
- Green S, Kumar V, Krust A, Chambon P (1987) The oestrogen receptor: structure and function. En: *Recent Advances in Steroid Hormone Action* ed. VK Moudgil, Gruyler & Co, Berlin.
- Guichard A, Cedard L, y Haffen K (1973) Aspect comparatif de la synthèse de stéroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de poulet à différents stades du développement (étude en culture organotypique à partir de précurseurs radioactifs). *Gen Comp Endocrinol* **20**:16-28.
- Guichard A, Haffen K, Cedard L, Mignot TM, Scheib D (1979) Effects of the hCG and of season on *in vitro* steroidogenesis by 18-day chick embryo gonads. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* **19**:1317-1325.
- Guichard A, Scheib D, Haffen K y Cedard L (1977) Radioimmunoassay of steroid hormones produced by embryonic chick gonads during organ culture. *J Steroid Biochem* **8**:599-602.
- Gustafson ML, Donahoe PK (1994) Male sex determination, current concepts of male sexual differentiation. *Ann Rev Med* **45**:505-524.
- Hahnel AC, Eddy EM (1986) Cell surface markers of mouse primordial germ cells defined by two monoclonal antibodies. *Gamete Res* **15**:25-34.

- Hall PF (1994) Testicular steroid synthesis, organization and regulation. En : The Physiology of Reproduction. Second Edition, Knobil E, Neill (eds.). Raven Press, New York, 1335-1362.
- Haqq CM, King CY, Ukiyama E, Falsafi S, Haqq TN, Donahoe PK, Weiss MA (1994) Molecular basis of mammalian sexual determination: activation of Müllerian inhibiting substance gene expression by SRY. *Science* 266:1494-1500.
- Heasman J, Hynes RD, Swan AP, Thomas V, Wyle CC (1981) Primordial germ cells of *Xenopus* embryos: The role of the fibronectin in their adhesion during migration. *Cell* 27: 437-447.
- Hernández Vértiz A, González del Pliego M, Velázquez P, Pedernera E (1993) Morphological changes in the thecal layer during the maturation of the preovulatory ovarian follicles of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol* 92:80-87.
- Hodges RD (1974) The Histology of the Fowl, Academic Press, New York, 300-417.
- Holderegger C, Keefer D (1986) The ontogeny of the mouse estrogen receptor: the pelvic region. *Amer J Anat* 177:285-297.
- Hughes CG (1963) The population of germ cells in the developing female chick. *J Embryol Exp Morph* 11(3):513-536.
- Ikeda Y, Lala DS, Luo X, Kim E, Moisan M-P, Parker KL (1993) Characterization of the mouse FTZ-FI gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol Endocrinol* 7: 852-860.
- Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL (1994) Developmental expression of mouse steroidogenic factor 1, an essential regulator of steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol* 8: 654-662.
- Ioannou JM (1964) Oogenesis in the guinea pig. *J Embryol Exp Morphol* 12:673-691.
- Jonsson CE, Terenius L (1965) Uptake of radioactive oestrogens in the chicken oviduct and some other organs. *Acta Endocrinol* 50:289-300.

- Jost A (1970) Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian fetus. *Phil Trans Roy Soc Lond B* **259**:1119-1130.
- Juárez-Oropeza MA, López V, Álvarez Fernández G, Gómez Y y Pedernera E (1995) Androstenedione metabolism in the indifferent stage of bovine gonad development. *J Exp Zool* **271**: 373-378.
- Kamiyoshi M, Niwa T, Tanaka K (1986) Nuclear estrogen receptor bindings in granulosa cells and estradiol-17 β contents in follicular membranes of the ovary of the hen during the ovulatory cycle. *Gen Comp Endocrinol* **61**:428-435.
- Kimble J, White JG (1981) Control germ cell development in the *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **81**:208-219.
- Klock G, Strahle U, Schutz G (1987) Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct. *Nature* **329**:734-736.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P y Lovell-Badge R (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* **351**: 117-121.
- Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R (1993) WT-1 is required for early kidney development. *Cell* **74**: 679-691.
- Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM, Chambon P (1986) The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J* **5**:891-897.
- Lance VA y Bogart MH (1992) Disruption of ovarian development in alligator embryos treated with aromatase inhibitor. *Gen Comp Endocrinol* **86**(1):59-71.
- Lee C, Keyes PL, Jacobson HI (1971) Estrogen receptor in the rabbit corpus luteum. *Science* **173**:1032-1033.
- Lee MM y Donahoe PK (1993) Müllerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr Rev* **14**(2):152-164.

- Luo X, Ikeda Y, Parker K (1994) A cell specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481-490.
- Madhok, TC, Leung BS y Stout LE (1987) Characterization of molibdate stabilized estrogen receptors by hydrophobic interaction HPLC: Resolution of two subunits. *Horm Res* 25:29-36.
- Mauleon P (1973) Modification de l'apparition et de l'évolution de la prophase méiotique dans l'ovaire d'embryon de brebis. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 13:89-102.
- Mauleon P, Bezard J, Terqui M (1977) Very early and transient 17 β -estradiol secretion by fetal sheep ovary. In vitro study. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 17:399-401.
- Maraud R, Vergnaud O, Rashedi M (1990) New insights on the mechanism of testis differentiation from the morphogenesis of experimentally induced testes in genetically female chick embryos. *Am J Anat* 188:429-437.
- Mc Carrey JR y Abbott KU (1982) Functional differentiation of chicks gonads following depletion of primordial and germ cells. *J Embryo Exp Morphol* 68:161-174.
- Mc Laren A (1991) Development of the mammalian gonad: the fate of the supporting cell lineage. *Bioessays* 13:151-56.
- McNaught RW, Dayani N, Smith RG (1990) Receptor interconversion model of hormone action. 1. Purification of a factor involved in conferring estradiol binding properties to the estrogen receptor. *Biochemistry* 29:2685-2890.
- Medina M, Chávez B, Pérez-Palacios G (1981) Defective androgen action at the cellular level in the androgen resistance syndrome. I. Differences between the complete and incomplete testicular feminization syndromes. *J Clin Endocrinol Metab* 53:1243-1246.
- Méndez C, Hofmann P, Pedernera E (1993) Effect of 17 β -estradiol on somatic and germ cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chick. *Gen Comp Endocrinol* 89:182-188.

- Méndez C, Chávez B, Vilchis F y Pedernera E (1994) Estrogen receptors in somatic and germ cells of the chicken ovary. *ARTA*
- Merk FB, Botticelli CR, Albright JT (1972) An intercellular response to estrogen by granulosa cells in the rat ovary; an electron microscope study. *Endocrinology* **90**:992-1007.
- Migliaccio A, Di Domenico M, Green S, de Falco A, Kajtaniak EL, Blasi F, Chambon P, Auricchio F (1989) Phosphorylation on tyrosine of in vitro synthesized human estrogen receptor activates its hormone binding. *Mol Endocrinol* **3**:1061-1069.
- Milewich L, George FW, Wilson JD (1977) Estrogen formation by the ovary of the rabbit embryo. *Endocrinology* **100**:187-196.
- Moger WH (1991) Evidence for compartmentation of cAMP-dependent protein kinase in rat Leydig cells. *Endocrinology*:**128**: 1414-1418.
- Moon YS, Raeside JI (1972) Histochemical studies on hydroxysteroid dehydrogenase activity of fetal pig testes. *Biol Reprod* **7**:278-287.
- Murdoch FE, Gorski J (1991) The role of ligand in estrogen receptor regulation of gene expression. *Mol Cell Endocrinol* **78**:C103-C108.
- Nitta H, Mason JI, Bahr JM (1993) Localization of 3- β hydroxy steroiddehydrogenase in the chicken ovarian follicles shifts from the theca layer to granulosa layer with follicular maturation. *Biol Reprod* **48**:110-116.
- Noma K, Nakao K, Sato B, Nishizawa Y, Matsumoto K, Yamamura Y (1980) Effect of molybdate on activation and stabilization of steroid receptors. *Endocrinology* **107**: 1205-1211.
- O'Malley BW, Strott CA (1993) Hormonas esteroides: metabolismo y mecanismo de acción. En: *Endocrinología de la Reproducción*. Yen SC y Jaffe RB Editores 3a.Ed. Editorial Médica Panamericana.
- Pedernera E, Velázquez P, Gómez Y, y González del Pliego M (1989) Isolation of steroidogenic cells subpopulations in the follicular theca of the ovary in the domestic fowl En: *Growth Factors and the Ovary*. (Hiershfield AN, ed.). 351-355 Plenum Press, New York.

- Pedernera E, Gómez Y, Velázquez P, Juárez-Oropeza MA, y González del Pliego M (1988) Identification of steroidogenic cells subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. *Gen Comp Endocrinol* 71: 153-162.
- Pencharz RJ (1940) Effect of estrogens and androgens alone and in combination with chorionic gonadotropin on the ovary of the hypophisectomized rat. *Science* 91:554-555.
- Picard D, Kumar V, Chambon P, Yamamoto KR (1990) Signal transduction by steroid hormones: Nuclear localization is differently regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. *Cell Regulation* 1:291-299.
- Porter TE, Hargis BM, Silsby JL, Halawani ME (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.
- Rao MC, Richards JS, Midgley AR (1978) Hormonal regulation of cell proliferation in the ovary. *Cell* 14:71-78.
- Richards JS (1975a) Content of nuclear estradiol receptor complex in rat corpora lutea during pregnancy: Relationship to estrogen concentrations and cytosol receptor availability. *Endocrinology* 96:227-230.
- Richards JS (1975b) Estradiol receptor content in rat granulosa cells during follicular development: Modification by estradiol and gonadotropins. *Endocrinology* 97:1174-1184.
- Richards JS (1980) Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev* 60:51-89.
- Richards JS, Jahnsen T, Hedin L, Lifka J, Ratoosh SL, Durica JM, Goldring NB (1987) Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent Prog Horm Res* 43:231-276.
- Richards JS, (1994) Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 15:725-751.
- Robel P, Levy C, Wolff JP, Nicolas JC, Baulieu EE (1978) *CR Acad.Sci* 287: 1353-1356.

- Romanoff AL (1960) The avian embryo. Mc Millan, New York.
- Salzgeber B, Reyss-Brion M, Baulieu EE (1981) Modifications des gonades femelles de l'embryon de Poulet après actions du tamoxifène. *C R Acad Sci Sér III* 293:133-137.
- Samsel J, Zeis A y Weniger JP, (1982) Féminisation du testicule embryonnaire de poulet par le diéthylstilboestro et action antagoniste du tamoxifène. *Biochimie* 64:369-376.
- Santoiani P, Ayala M (1965) Fluorometric microanalysis of deoxiribonucleic acid in human skin. *J Invest Dermatol* 45:99-103.
- Satoh M (1991) Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos. *J Anat* 177:85-107.
- Scheib D (1983) Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation Suppl* 23:87-92.
- Scheib D, Haffen K (1969) Apparition et localization des hydroxystéroïde-déshydrogénases ($\Delta^5-3\beta$ et 17β) dans les gonades de l'embryon et du poussin chez la caille (*Coturnix coturnix japonica*). Etude histo enzymologique et comparaison avec le poulet (*Gallus gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol* 12: 586-597.
- Scott RS, Rennie PI (1971) An estrogen receptor in the corpora lutea of the pseudopregnant rabbit. *Endocrinology* 89:297-301.
- Segaloff DL, Wang H, Richards JS (1990) Hormonal regulation of LH/chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovarian cells during follicular development and luteinization. *Mol Endocrinol* 4:1856-1865.
- Shemesh M, Hansel W (1983) Hormone production by the early bovine embryo. *J Steroid Biochem* 19:979-983.
- Steinberg E (1971) Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol Rev* 51:1-22.
- Stumpf WE (1969) Nuclear concentration on [3 H]17 β -estradiol in target tissues. dry-mount autorradiography of vagina, oviduct, ovary, testis, mammary tumor, liver and adrenal. *Endocrinology* 85:31.
- Stumpf WE, Narbaitz R, Sar M (1980) Estrogen receptors in the fetal mouse. *J Steroid Biochem* 12:55-64.

- Sturkie PD (1976) Avian physiology, 3rd ed Springer-Verlag, New York.
- Tanabe Y, Saito N y Nakamura T (1986) Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*) *Gen Comp Endocrinol* **63**:456-463.
- Teng CS y Teng CT, (1976) Studies of sex organ development. Oestrogen receptor on developing chick müllerian duct.. *J Biochem* **154**:1-9.
- Teng CT y Teng CS, (1977) Studies on sex organ development. The hormonal regulation of steroidogenesis and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in embryonic-chick ovary. *J Biochem* **162**:123-134.
- Teng CT, (1982) Differential response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. *Gen Comp Endocrinol* **48**:325-332.
- Toaff ME, Strauss JF, Hammond JM (1983) Regulation of cytochrome P-450_{ssc} in the immature porcine granulosa cells by FSH and estradiol. *Endocrinology* **12**:1156-1158.
- Traish A, Kim N, Wotiz HH (1989) Characterization of polyclonal antibodies to preselected domains of the human estrogen receptor. *Endocrinology* **125**:1-8.
- Vázquez-Nin GH, Echeverría OM, Fakan S, Traish AM, Wotiz HH, Martín E (1991) Immunoelectron microscopic localization of estrogen receptor on premRNA containing constituents of rat uterine cell nuclei. *Exp Cell Res* **192**:396-404.
- Van Tienhoven A (1957) A method of "controlling sex" by dipping of eggs in hormone solutions. *Polít Sci* **36**:628-632.
- Velázquez P, Peralta I, Hernández E, Pedernera E (1995) Onset of FSH response during development of the ovary in the chick embryo. *Biol Reprod* **52** Supp 1): 85.
- Velázquez P, Gómez Y, González del Pliego M, 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.

- Veldhuis JD (1985) Biopotential actions of estrogens on progesterone biosynthesis by ovarian cells. II Relation of estradiol stimulatory actions to cholesterol and progestin metabolism in cultured swine granulosa cells. *Endocrinology*: 117:1076-1083.
- Weniger JP (1962) Diffusion des hormones gonadiques de l' embryon de poulet dans le milieu de culture. *Arch Anat Micr Morph Exp* 51:325-336.
- Weniger JP (1987) Sécrétion de Stéroïdes par les gonades embryonnaires d' Oiseaux. *Reprod Nutr Develop* 27 (4):745-753.
- Weniger JP (1991) Estrogen secretion by the chick embryo ovary. *Exp Clin Endocrinol* 98:(1):9-14.
- Weniger JP y Chouraqui J (1988) Action de LH sur la sécrétion d'oestradiol par l'ovaire embryonnaire de poulet en culture in vitro. *Reprod Nutr Develop* 28 (6 A): 1473-77.
- Weniger JP, Chouraqui J y Zeis A (1989) 17 β -estradiol secretion in normal and hypophysectomized chick embryos. *Reprod Nutr Develop* 9: 89-93.
- Weniger JP, Chouraqui J y Zeis A (1990a) Estradiol secretion by the ovary of 19-day-old hypophysectomized and sham operated chick embryos. *J Steroid Biochem* 5 (5): 607-609.
- Weniger JP, Chouraqui J y Zeis A (1990b) Pituitary control of estrogen secretion in the chick embryo: true or spurious?. *Gen Comp Endocrinol* 79:346-350.
- Weniger JP, Chouraqui J y Zeis A (1991) Effect of partial decapitation (hypophysectomy) on 17 β -estradiol secretion by the chick embryo ovary. *Differentiation* 47:57-59.
- Weniger JP, Zeis A (1971) Biosynthèse d'oeostrogènes par les ébauches gonadiques de poulet. *Gen Comp Endocrinol* 16:391-397.
- Williams PC (1940) Effect of stilbestrol on the ovaries of hypophysectomized rats. *Nature* 145:388-389.
- Wolff E, (1978) New trends in the problem of sex differentiation. *Medical Biology* 56: 403-406.

- Wolff E, (1979) Old experiments and new trends in avian sex differentiation. *In Vitro* 15: 6-10.
- Wolff E, Ginglinger A (1935) Sur la production expérimentale d'inter-sexués par injection de folliculine à l'embryon de poulet. *C R Acad Sci* 200:2118.
- Wolff E y Haffen K (1952) Sur l'intersexualité expérimentale des gonades embryonnaires d'oiseau en culture "in vitro". *Arch Anat Micr Morph Exp* 41:184-207.
- Woods JE (1987) Maturation of the hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal (HAG) axes in the chick embryo. *J Exp Zool Suppl* 1:265-272.
- Woods JE y Brazzill MD (1981) Plasma 17 β -estradiol levels in the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 44:37-43.
- Woods JE, Damianides-Keenan M, Thommes RC (1991) FSH and TH binding cells in the ovary of the developing chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 82: 487-494.
- Woods JE, Erton LH (1978) The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 36:360-370.
- Woods JE, Hopkins WE, Caliendo J, Sorrentino MJ, Mateus JB, Thommes RC (1985) Ontogenesis of LH-RH. The hypothalamus and LH and FSH in the pars distalis of the chick embryo. En: Current trends in comparative endocrinology. Lofts B, Holmes WK (eds.). Hong Kong University Press. Hong Kong, pp131-134.
- Woods JE, Rutherford, JE y Thommes, RC (1983) Functional development of the hypothalamic-adenohypophyseal-testicular (AHT) axis in the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 50: 235-241.
- Woods JE, Mennella JA, Thommes RC (1981) The Hypotalamic Adenohypophyseal gonadal axes in the developing chick embryo I.LH sensitivity. *Gen Comp Endocrinol* 45:66-73.
- Woods JE, Scanes CG, Seeley M, Cozzi P, Onyese F Thommes RC (1989) Plasma LH and gonadal LH-binding cells in normal and surgically decapitated chick embryos. *Gen Comp Endocrinol* 74: 1-13.

- Woods JE, Thommes RC (1984) Ontogeny of hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal (HAG) interrelationships in the chick embryo. *J Exp Zool* **232**:435-441.
- Wu TC, Wang L, Wang YJ (1992) Expression of estrogen receptor gene in mouse oocyte during embryogenesis. *Mol Reprod Dev* **33**(4):407-412.
- Wu TC, Wang L, Wang YJ (1993) Detection of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in human oocytes and cumulus-oocyte complexes using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Fertil Steril* **59**:54-59.
- Yamamoto KR, Alberts BM (1976) Steroids receptors: elements for modulation of eukaryotic transcription. *Ann Rev Biochem* **45**:721-746.
- Zhuang LZ, Adashi EY, Hsueh AJW (1982) Direct enhancement of gonadotropin stimulated ovarian estrogen biosynthesis by estrogen and clomiphene.citrate. *Endocrinology*. **110**:2219-2221.

Effect of 17 β -Estradiol on Somatic and Germ Cell Subpopulations in the Ovary of the Newly Hatched Chick

CARMEN MÉNDEZ-HERRERA, PABLO HOFMANN, AND ENRIQUE PEDERNERA

Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, DF 04510, México

Accepted August 10, 1992

The involvement of estrogens in avian ovary differentiation and morphogenesis has been previously demonstrated by several authors. The aim of the present study is to provide evidence regarding which cell subpopulations of the ovary are target cells for 17 β -estradiol during chick development. White Leghorn chick embryos received 200 ng of the hormone or the vehicle on the chorioallantoic membrane at 11, 13, and 15 days of incubation. Within 24 hr after hatching, the left ovary was processed for total cell count, study of the meiotic prophase of oocytes, and the morphometric evaluation of the cortical and the medullary regions of the ovary. Germ cell number was not modified by the treatment. Similarly, no changes were observed in the stage of the prophase and the cellular area of oocytes. The total number of somatic cells was increased in the newly hatched chick ovary treated with 17 β -estradiol. The number of undifferentiated cells in the juxtacortical medulla was higher in the treated ovary than in the control group. Moreover, the pregranulosa cells of the cortical region were hypertrophied in the 17 β -estradiol treated ovary. However, no changes were observed in the typical steroidogenic cells after the estrogen treatment. In conclusion, two subpopulations of somatic cells are estrogen target cells in the prefollicular chicken ovary: the pregranulosa cells of the ovarian cortex and the undifferentiated cells in the juxtacortical medulla. © 1993 Academic Press, Inc.

The ovarian biosynthesis of estrone (E₁) and 17 β -estradiol (E₂) during chick development has been demonstrated for embryos at 6-7 days of incubation (Weniger and Zeis, 1971; Galli and Wassermann, 1973; Guichard *et al.*, 1977) and estrogen secretion *in vitro* has been observed from 7 to 18 days of incubation (Guichard *et al.*, 1977, 1979; Weniger and Chouraqui, 1988). The levels of E₁ in plasma of chick embryos reach their maximum value at 13.5 days of incubation and remain stable up to 17.5 days of development (Woods *et al.*, 1982), while E₂ increases gradually up to that age (Woods and Brazzil, 1981). In the latter studies, the steroidogenic function of the ovary seems to start earlier and at a higher degree than in the developing chick testis.

The 17 β -estradiol secretion is stimulated by LH treatment from Day 7 to Day 8 of incubation (Woods *et al.*, 1982; Weniger

and Chouraqui, 1988). Moreover, *in vivo* studies suggest the establishment of adeno-hypophyseal gonadotropin regulation of ovarian E₂ secretion as early as Day 10 of incubation (Weniger, 1991).

The involvement of estrogens in avian ovary differentiation and morphogenesis has been previously considered (for reviews, see: Scheib, 1983; Weniger, 1987). The binding of labeled E₂ to the surface epithelium and the medulla of chick embryo ovary has been observed (Gasc, 1980). A single treatment of chick embryos with an aromatase inhibitor before Day 7 of incubation caused permanent sex reversal in females (Elbrecht and Smith, 1992). In experiments with the antiestrogen tamoxifen, a reduction in the growth of the cortical region of the ovary has been described (Salzgeber *et al.*, 1981).

More information is needed about the

cellular subpopulations of the developing avian ovary which could be target cells for estrogens. Using quantitative methods to evaluate the total number and the morphological changes of germ and somatic cells in the chicken ovary, the present study provides evidence about which cell populations are modified by 17β -estradiol treatment. The somatic cells of the ovary, specifically the undifferentiated cells of the juxtacortical medulla and the pregranulosa cells of the cortical region, are proposed as target cells for E_2 in the prefollicular chick ovary.

MATERIALS AND METHODS

Chick embryos (Babcock B 300) were treated with 200 ng of 17β -estradiol (Steraloids, Wilton, NH). The steroid solution (in 4% ethanol) was applied to chorioallantoic membrane at 11, 13, and 15 days of incubation. Control embryos received the ethanol solution. The left ovary was dissected and processed for total cell count at 13, 15, and 17 days of embryonic development and within 24 hr after hatching. For morphometric measurements and the study of meiotic prophase of the oocyte, the left ovary of newly hatched chicks was employed.

Ovary cell count. The left ovary was carefully dissected and immersed in 2 ml of 0.25% trypsin (GIBCO, Grand Island, NY), in phosphate-buffered saline (Ca^{2+} and Mg^{2+} free) solution, with a pH of 7.4 at 37° in a shaking bath (90 cycles/min). The ovaries were passed through a fire-polished Pasteur pipet every 10 min, until the ovary was completely dissociated (approximately 30 min). Soybean trypsin inhibitor (GIBCO) 0.5% was added, at a 1:5 to 1 rate. All glassware was siliconized (Sigmacote, Sigma, St. Louis, MO). Double blind samples of the cell suspension were counted with a hemacytometer. Cells were classified as: (a) oocytes, having a diameter greater than 25 μ m, the eccentric nucleus, and the Balbiani body, (b) somatic cells with lipid inclusions, diameter 20 μ m or less, with five or more visible lipid droplets in the cytoplasm, and (c) somatic cells, with a diameter less than 20 μ m, without lipid inclusions (cells that are not included in (a) and (b)). Nucleated blood cells were not counted.

Meiotic prophase study. For the determination of meiotic prophase stage of primary oocytes, ovaries of newly hatched chicks were gently rubbed against a nylon mesh, and isolated cell suspensions were hypotonically treated according to Evans *et al.* (1964). The cell smears were stained with Giemsa, and oocytes

were classified in the corresponding prophase stage and expressed as a percentage.

Morphometric study. Fragments of the left ovary taken from 20 newly hatched chicks were fixed in glutaraldehyde 2.5%, postfixed in osmium tetroxide 1%, and embedded in plastic resins. Sections 0.5–1.0 μ m thick were stained with toluidine blue and observed at 1000X under a microscope with a video-camera. Using Biocom's software (Les Ulis Cedex, France) the following measurements were performed in the ovarian cortex: (a) cellular area of oocytes, (b) cellular area of pregranulosa somatic cells (the cytoplasm is dark-stained by toluidine blue and can be easily segregated), and (c) number of oocytes and pregranulosa cells per area unit. In the juxtacortical medulla: (d) the cytoplasmic area of typical steroidogenic cells, and (e) the number of undifferentiated cells and steroidogenic cells per area unit. The area corresponding to the lumen of blood vessels and to the lacunary system was subtracted. The measurements were done in three areas (2840 μ m²) of the sections obtained from two random samples of each ovary.

Student's *t* test was employed for statistical analysis of the data.

RESULTS

Total cell number. The total germ cell count in the chick ovary reached a peak at 17 days of incubation. A reduction in the number of germ cell was observed afterward. There were no significant differences in the germ cell numbers at any age between the E_2 treated and the control ovaries (Fig. 1).

The somatic cell number increased in the control ovary up to Day 17 of incubation and stabilized thereafter. In the treated chick ovary, the somatic cell number continued increasing until hatching (Fig. 2). The somatic cell count in the newly hatched chick ovary of the treated group was higher than in the control group. The significant difference being the increase in the somatic cells without lipid droplets (Fig. 3).

Morphometric study. The microscopic images of the cortex and the juxtacortical medulla are illustrated in Fig. 4. Measurement of the cellular area of the oocytes showed no difference between the treated and control groups (Table 1). The cellular area of the somatic pregranulosa cells was

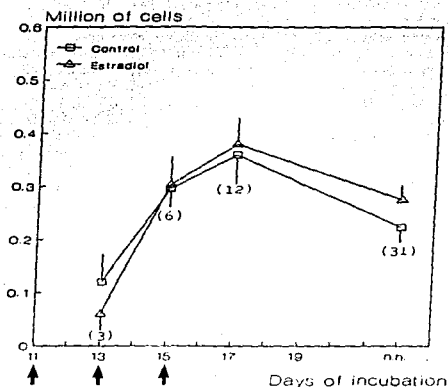


FIG. 1. Total number of germ cells in the ovary from Day 13 of incubation to newly hatched chick treated with estrogens. Arrows indicate the ages at which embryos received 200 ng of 17β -estradiol. Values represent means \pm SEM (*n*).

noticeably increased in the chick ovary that received 17β -estradiol (Table 1), whereas the cytoplasmic area of typical steroidogenic cells was not modified by E_2 treatment (Table 1).

The number of undifferentiated cells in the juxtacortical medulla of the ovary was increased in the treated chick (Table 1). There were no significant changes in the number of oocytes, pregranulosa cells and steroidogenic cells in either experimental group (Table 1).

The percentage of oocytes found in each stage of the meiotic prophase was similar in the E_2 treated and control ovary of the newly hatched chick (Table 2).

DISCUSSION

The method employed to evaluate the total number of ovarian cells has been previously used to measure the total number of germ cells in the chicken embryo (McCar-

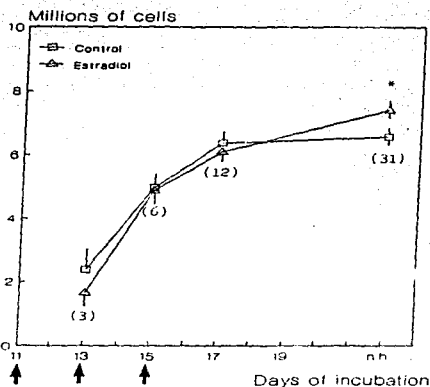


FIG. 2. Changes in the total number of somatic cells during the development of the chick ovary after estrogen treatment. Arrows indicate the ages at which embryos received 200 ng of 17β -estradiol. Values represent means \pm SEM (*n*). * $P < 0.05$.

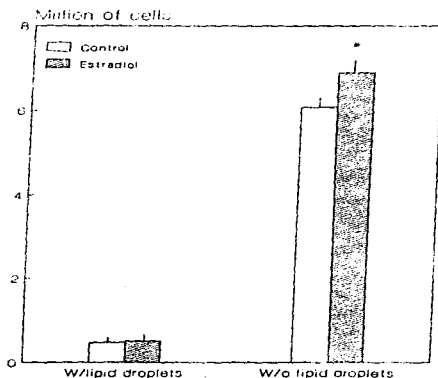


FIG. 3. Number of somatic cells, with or without lipid droplets in the cytoplasm, in the ovary of the newly hatched chick. Values correspond to the experimental groups of Fig. 2, and represent means \pm SEM. * $P < 0.05$.

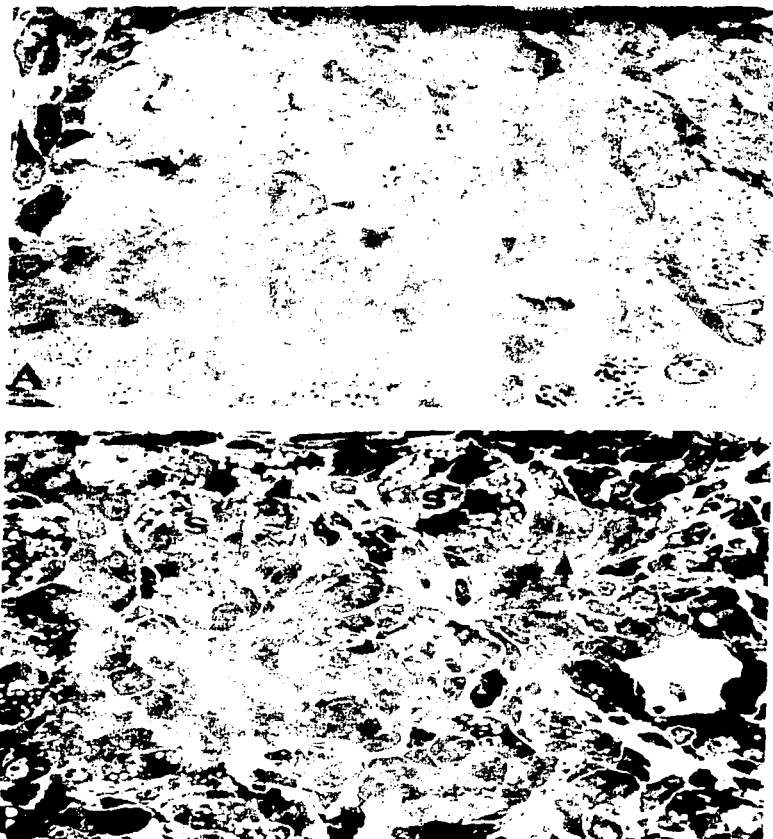


FIG. 4. Photomicrograph of the ovary in the newly hatched chick. In the cortex (A), oocytes and pregranulosa cells (arrowheads) are shown. In the ovarian medulla (B), islets of typical steroidogenic cells (S) and undifferentiated cells (arrows) were identified. (1200 \times)

TABLE 1
MORPHOMETRIC MEASUREMENTS IN SECTIONS OF THE NEWLY HATCHED CHICK OVARY TREATED WITH 17 β -ESTRADIOL

Cellular type	n	Number of cells/1000 μm^2		Cellular area (μm^2)	
		Control	Estradiol	Control	Estradiol
Oocytes I	7	5.6 \pm 0.3	5.6 \pm 0.3	152 \pm 7.7	144 \pm 4.5
Pregranulosa cells	7	3.1 \pm 0.4	2.6 \pm 0.3	50 \pm 4.5	78 \pm 3.8***
Steroidogenic cells	10	2.4 \pm 0.2	2.0 \pm 0.3	97 \pm 3.7	115 \pm 9.3
Undifferentiated cells	10	12.0 \pm 0.7	16.1 \pm 0.7***	-	-

Note. Values represent means \pm SEM. *** $P < 0.001$.

rey and Abbot, 1982). The values obtained in the present study are similar to those obtained by Hughes (1963) using serial sections of the whole ovary in the chick embryo. The results confirm the previous finding of the maximum number of germ cells, obtained at Day 17 of incubation and the subsequent reduction in the ovary of the newly hatched chick (Hughes, 1963). Although the above cited paper did not evaluate the somatic cell count, our results show that the maximum number of somatic cells is also reached at 17 days, remaining stable after that point.

The germ cells seem to not be affected by the treatment with E_2 , since the maximal number of germ cells observed at 17 days of incubation was not increased. Moreover, in the newly hatched chick the oocytes show no changes in the total number, the cellular size, nor in the stage of the meiotic prophase.

The proliferative effect of E_2 was limited to the somatic cell population which was increased in the ovary of the newly hatched chick. Several cell types should be consid-

ered within the somatic cell population: (a) pregranulosa cells (stellated cells that enclose the oocytes in the cortical region); (b) typical steroidogenic cells, with abundant lipid droplets in the cytoplasm, forming islets of serial sizes in the ovarian medulla; (c) undifferentiated cells forming cords limited by a basal lamina in the juxtacortical medulla (González del Pliego *et al.*, 1988); and (d) fibroblasts.

The pregranulosa cells were clearly hypertrophied by E_2 treatment. A similar effect was observed in the granulosa cells of the follicle in the adult mammalian ovary (Merk *et al.*, 1972; Richards, 1975). Growth and hyperemia of ovarian follicles in the lizard was also induced by estrogens (Jones, 1975), although pregranulosa cell proliferation was not observed in the germinal bed (Tokarz, 1978). Thus, the effect herein described could be expected in the chicken ovary, if these cells are the precursor cells of the granulosa layer in the adult ovarian follicle.

There was no significant increase in typical steroidogenic cells in the treated chick

TABLE 2
STAGES OF THE MEIOTIC PROPHASE (EXPRESSED IN PERCENTAGE) OF PRIMARY OOCYTES IN THE NEWLY HATCHED CHICK OVARY TREATED WITH 17 β -ESTRADIOL

Treatment	n	Prophase stage		
		Leptotene	Zygotene	Pachytene
Control	6	4.5 \pm 1.5	83.2 \pm 5.4	12.2 \pm 5.6
17 β -Estradiol	10	7.0 \pm 2.1	83.5 \pm 3.2	8.7 \pm 2.0

Note. Values represent means \pm SEM.

ovary, and no changes in the cellular area of this subpopulation was observed. This cellular type shows a positive immunohistochemical reaction for androgens (Woods and Podczasky, 1974), secretes testosterone when isolated in a density gradient (Pedernera *et al.*, 1988), and seems not to be affected by estrogen treatment.

According to the ultrastructural characteristics of the estrogen-secreting cells isolated in a density gradient from the left ovary of the newly hatched chick, the undifferentiated cells of the juxtacortical medulla seem to be a source of estrogens (Pedernera *et al.*, 1988). These results do not agree with previous reports that detect 17 β -estradiol in the cortical cords of the left ovary of 1-day-old chicks (Woods and Erton, 1978), however, the presence of E₂ in a cell does not necessarily indicate biosynthesis. The undifferentiated cells of the juxtacortical medulla of the immature left ovary are found in the follicular theca in chicks of up to 1 month old (González del Pliego, 1991). These cells are finally located in the theca externa of the avian adult ovary, which have been determined to be estrogen secreting (Pedernera *et al.*, 1989; Porter *et al.*, 1989; Velázquez *et al.*, 1991); moreover, they are aromatase-positive by immunocytochemical reaction (Nitta *et al.*, 1991). The chick ovary following a 17 β -estradiol treatment represents a positive regulation for the estrogen production.

The present results together with previous studies (Salzgeber *et al.*, 1981; Elbrecht and Smith, 1992) support the hypothesis that, besides the influence on the müllerian duct-related structures, 17 β -estradiol secretion by the developing chicken ovary is involved in the normal differentiation and morphogenesis of the ovary itself. Moreover, two subpopulations of somatic cells in the prefollicular ovary of the newly hatched chicken were identified as estrogen target cells, the pregranulosa cells of the ovarian cortex and the undifferentiated cells in the juxtacortical medulla.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by DGAPA-UNAM IN306491.

REFERENCES

- Elbrecht, A., and Smith, R. G. (1992). Aromatase enzyme activity and sex determinations in chicken. *Science* 255, 467-470.
- Evans, E. P., Brekon, G., and Ford, C. E. (1964). An air-drying method for meiotic preparation from mammalian testis. *Cytogenetics* 3, 289-294.
- Galli, F. E., and Wasserman, G. F. (1973). Steroid biosynthesis by gonads of 7- and 10-day-old chick embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.* 21, 77-83.
- Gasc, J. M. (1980). Estrogen target cells in gonads of the chicken embryo during sexual differentiation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 55, 331-342.
- González de Pliego, M. (1991). "Estudio ultraestructural de las poblaciones esteroideogénicas durante el desarrollo del ovario de las aves." doctoral thesis. Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México, D.F., México.
- González del Pliego, M., González-Morán, G., and Pedernera, E. (1988). Ultrastructure of the ovarian medulla in the newly hatched chick treated with human chorionic gonadotropin. *Cell Tissue Res.* 253, 665-670.
- Guichard, A., Cedard, L., Mignot, Th.-M., Scheib, D., and Haffen, K. (1977). Radioimmunoassay of steroid produced by cultured chick embryonic gonads: Differences according to age, sex, and side. *Gen. Comp. Endocrinol.* 32, 255-265.
- Guichard, A., Haffen K., Cedard, L., Mignot, Th.-M., and Scheib, D. (1979). Effects of the hCG and of season on "in vitro" steroidogenesis by 18-day chick embryo gonads. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 19, 1317-1325.
- Hughes, G. C. (1963). The population of germ cells in the developing female chick. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 11, 513-536.
- Jones, R. E. (1975). Endocrine control of clutch size in reptiles: IV Estrogen-induced hyperemia and growth of ovarian follicles in the lizard "Anolis carolinensis". *Gen. Comp. Endocrinol.* 25, 211-222.
- McCurrey, J. R., and Abbott, K. U. (1982). Functional differentiation of chicks gonads following depletion of primordial germ cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 68, 161-174.
- Merk, F. B., Botticelli, C. R., and Albright, J. T. (1972). An intercellular response to estrogen by granulosa cells in the rat ovary: An electron microscope study. *Endocrinology* 90, 992.
- Nitta, H., Osawa, Y., and Bahr, J. (1991). Multiple steroidogenic cell populations in the thecal layer

- of preovulatory follicles of the chicken ovary. *Endocrinology* 129, 2033-2040.
- Pedernera, E., Gómez, Y., Velázquez, P., Juárez-Oropeza, M. A., and González del Pliego, M. (1988). Identification of steroidogenic cells subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71, 153-162.
- Pedernera, E., Velázquez, P., Gómez, Y., and González del Pliego, M. (1989). Isolation of steroidogenic cell subpopulations in the follicular theca of the ovary in the domestic fowl. In "Growth Factors and the Ovary" (A. N. Hirschfeld, Ed.), pp. 351-355. Plenum, New York.
- Porter, T. E., Hargis, B. M., Silsby, J. L., and El Halawani, M. E. (1989). Differential steroid production between theca interna and theca externa cells: A three-cell model for follicular steroidogenesis in avian species. *Endocrinology* 125(1), 109-116.
- Richards, J. S. (1975). Estradiol receptor content in rat granulosa cells during follicular development: Modification by estradiol and gonadotropins. *Endocrinology* 97, 1174.
- Salzgeber, B., Reyss-Brion, M., and Baulieu, F. E. (1981). Modifications des gonades femelles de l'embryon de Poulet après actions du tamoxifène. *C.R. Acad. Sci. (Paris) Sér.* 111 293, 133-137.
- Scheib, D. (1983). Effect and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation Suppl.* 23, 87-92.
- Tokarz, R. (1978). An autoradiographic study of the effects of mammalian gonadotropins (follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone) and estradiol-17 β on [3 H]thymidine labeling of surface epithelial cells, prefollicular cells, and oogonia in the ovary of the lizard *Anolis carolinensis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 35, 179-188.
- Velázquez, P., Gómez, Y., González del Pliego, M., and 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.
- Weniger, J.-P. (1991). Estrogen secretion by the chick embryo ovary. *Exp. Clin. Endocrinol.* 98(1), 9-14.
- Weniger, J.-P. (1987). Secretion de stéroïdes par les gonades embryonnaires d'oiseaux. *Reprod. Nutr. Dev.* 27(4), 745-753.
- Weniger, J.-P., and Chouraqui J. (1988). Action de LH sur la sécrétion d'oestradiol par l'ovarie embryonnaire de Poulet en culture "in vitro". *Reprod. Nutr. Dev.* 28(6A), 1473-1477.
- Weniger, J.-P., and Zeis, A. (1971). Biosynthèse d'oestrogènes par les ébauches gonadiques de poulet. *Gen. Comp. Endocrinol.* 16, 391-395.
- Woods, J. E., and Brazzill, D. M. (1981). Plasma 17 β -estradiol levels in the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44, 37-43.
- Woods, J. E., Congoran, D. D., and Thomas, R. C. (1982). Plasma estrone levels in the chick embryo. *Pault. Sci.* 61, 1729-1733.
- Woods, J. E., and Erton, L. (1978). The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 36, 360-370.
- Woods, J. E., and Podczaski, I. (1974). Androgen synthesis in the gonads of the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 24, 413-423.