

11261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

METABOLISMO DE HORMONAS ESTEROIDES EN LA
MEMBRANA CORIOALANTOIDEA DE EMBRIONES
DE POLLO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
**MAESTRA EN CIENCIAS
BIOMEDICAS (MORFOLOGIA)**
P R E S E N T A
BIOL. ANA HILDA FIGUEROA GUTIERREZ

ASESOR: DR. ENRIQUE PEDERNERA ASTEGIANO

MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado, por su valiosa colaboración:

Dr. Vicente Días Sánchez
Dr. Marco A. Juárez Oropeza
Dr. Enrique Pedernera Astegiano
Dr. Guillermo Mendoza Hernández
M. en C. Bertha A. Chávez Cano

A todos mis compañeros de laboratorio, por su inapreciable apoyo y su orientación.

A mis padres, hermanos y amigos, gracias por todo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	ii
INTRUCCIÓN.....	1
Estructura y función de la membrana corioalantoidea.....	1
Analogía entre la MCA y la placenta.....	6
Esteroidogénesis.....	7
Intracrinología y localización de 3 β -HSD en tejidos periféricos.....	15
Isoformas de 3 β -HSD.....	18
JUSTIFICACIÓN.....	22
OBJETIVOS.....	23
HIPÓTESIS.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Reactivos.....	24
Métodos.....	25
RESULTADOS.....	30
DISCUSIÓN.....	43
REFERENCIAS.....	53
ANEXOS.....	60

RESUMEN

La membrana corioalantoidea (MCA) del embrión de pollo desempeña funciones metabólicas importantes durante el desarrollo embrionario, entre las que se encuentran el intercambio gaseoso y la absorción de calcio del cascarón. Sin embargo, existe poca información con respecto a su posible función en el metabolismo de esteroides, por lo cual el objetivo de este trabajo fue investigar si las células de la MCA del embrión de pollo tienen la capacidad de metabolizar esteroides sexuales. Por lo anterior, se incubaron huevos fértiles de la raza White Leghorn (Babcock B300) a 37.8°C, obteniendo la MCA a los 10, 11, 12, 13, 15 y 17 días de desarrollo (según tablas de Hamburger y Hamilton). Las células de la membrana se disociaron por digestión con tripsina; la reacción enzimática se detuvo con inhibidor de tripsina. Alícuotas de 5×10^5 células fueron incubadas durante 60 minutos en medio de cultivo Dulbecco más albúmina sérica bovina, adicionando 0.1 μ Ci de los siguientes precursores tritiados: dehidroepiandrosterona (DHEA), pregnenolona (P_5) o androstendiona (A_4). Posteriormente, se recuperaron los metabolitos por extracción con éter. La separación de los mismos se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina, desarrollada con diclorometano: acetato de etilo 6:4 v/v o éter etílico: hexano 3:1 v/v. La identidad de los metabolitos se confirmó por recristalizaciones sucesivas. Los resultados mostraron que el principal metabolito encontrado a partir de DHEA fue A_4 . Los mayores porcentajes de transformación se observaron en los embriones de 13 a 17 días de edad embrionaria ($P < 0.05$) comparados con los de menores edades. Analizando los sexos por separado, se observó que las hembras de 15 días tuvieron la mayor producción de A_4 , siendo distinta a las demás edades. Esto indica la presencia de la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa, expresándose de manera diferencial en ambos sexos. Un segundo metabolito detectado a partir de DHEA, fue Δ^5 -diol, con porcentajes de transformación menores al 10%, encontrando hacia los 12 días su mayor producción. Lo anterior sugiere la presencia de la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en la MCA. A partir de la incubación con P_5 , el principal metabolito identificado fue 17α -hidroxipregnenolona, señalando la presencia de la 17α -hidroxilasa, pero no la actividad de la C17,20-liasa del citocromo P450_{C17} en esta membrana. El hecho de haber encontrado la actividad de estas enzimas en la MCA sugiere que este tejido puede estar contribuyendo con la formación de esteroides sexuales durante el desarrollo del embrión de pollo.

INTRODUCCIÓN

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA MEMBRANA CORIOALANTOIDEA

La membrana corioalantoidea (MCA) constituye un medio a través del cual el embrión de pollo adquiere muchos de los elementos necesarios para su desarrollo.

Dentro de las funciones principales de la MCA están el intercambio gaseoso, la absorción de calcio desde el cascarón y el evitar la desecación. Esta estructura funciona como un contenedor para el gasto metabólico del embrión en desarrollo (Owczarzak, 1971; Lillie, 1927).

Entre los 4 y 5 días de incubación, la alantoides aparece como un divertículo de la pared ventral de la porción caudal del intestino del embrión (Carlson, 1990), se alarga gradualmente y se fusiona con el corion entre los 5 y 6 días de incubación (Tuan, 1980); hacia los 7 días se ha extendido para cubrir más de la mitad de la superficie interna del cascarón (Leeson y Leeson, 1963). Alrededor de los 10 días, la MCA envuelve por completo al embrión, teniendo una superficie total de 70 a 80 cm² (Tuan, 1980; Metcalfe y Stock, 1993).

El endodermo alantoico está compuesto por una sola capa de células cúbicas con un núcleo grande redondeado u oval. Existe una capa de mesénquima adyacente cuyas células poseen prolongaciones citoplásmicas dirigidas a una sustancia intercelular amorfa; la capa mesodérmica de la alantoides se fusiona a la capa mesodérmica adyacente del corion. En este estrato doble de mesodermo se desarrolla una rica red vascular que está conectada a la

circulación del embrión mediante las venas y arterias alantoideas (Leeson y Leeson, 1963).

La MCA madura es una membrana delgada, compuesta de tres láminas, que son: a) ectodermo, compuesto de alrededor de dos capas de células; b) mesodermo, que cuenta con unas cuantas células y c) endodermo, que consta de una sola capa celular. La capa externa del ectodermo contiene células especializadas con procesos apicales que se extienden sobre la superficie de otras células y están firmemente unidas a la membrana interna del cascarón (Ar y cols., 1987).

Durante el desarrollo de la MCA sus capilares se desplazan hacia la superficie y a los 13 días hay una extensa red de espacios vasculares intraepiteliales a través del corion. En esta etapa aparece un tipo de células especializadas, las células intercalares (Skalinsky y Kondalenko, 1963), también llamadas células absorbedoras de calcio (Owczarzak, 1971) o células de la cavidad vellosa (Coleman y Terepka, 1972), que se caracterizan por tener numerosas vacuolas apicales y largas microvellosidades dirigidas hacia una profunda cavidad que se forma entre la superficie apical de estas células y la membrana interna del cascarón (Narbaitz, 1977; Komazaki y cols., 1992). Las células de la cavidad vellosa son ricas en anhídrido carbónico por lo que secretan ácido carbónico y están involucradas en la disolución y el transporte de calcio a partir del cascarón (Owczarzak, 1971; Clark y Simkiss, 1980; Dunn y Fitzharris, 1987). (Figura 1)

Otro tipo celular son las células que cubren a los capilares, que dirigen procesos citoplásmicos lamelares que se

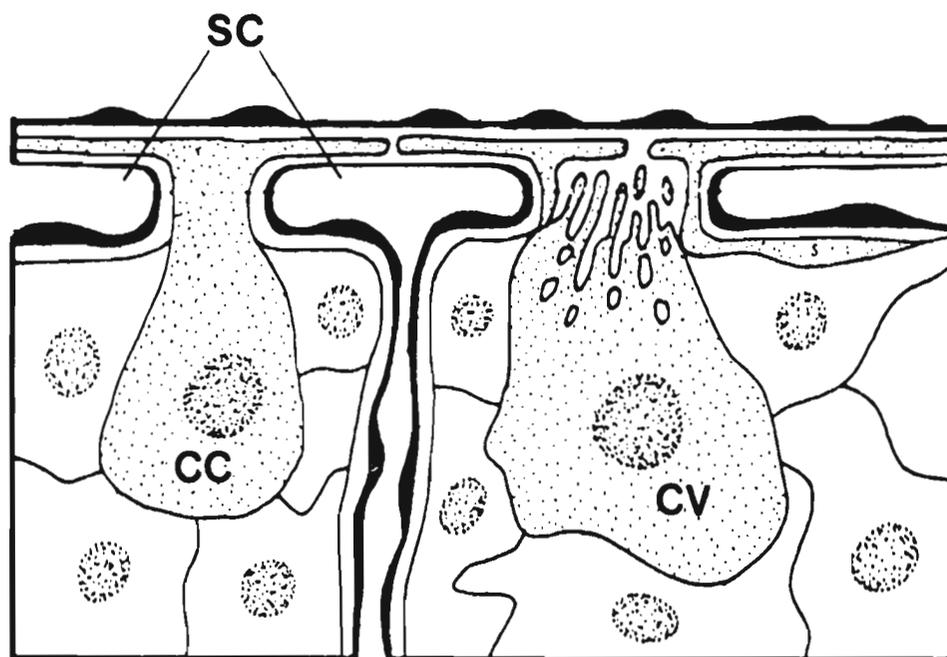


Figura 1. Representación esquemática de un corte transversal del epitelio coriónico. C.C., células que cubren a los capilares; C.V., células de la cavidad vellosa; S.C., seno capilar.

extienden sobre los capilares que forman la red vascular, y se unen estrechamente a la membrana interna del cascarón (Narbaitz, 1977; Maragoudakis y cols., 1988; Komazaki y cols., 1992). Existen además, células coriónicas indiferenciadas, que son las más numerosas y se encuentran distribuidas entre los otros dos tipos celulares mencionados; algunas de estas células son oscuras y parecen estar en degeneración (Narbaitz, 1977; Komazaki y cols., 1992).

También se han descrito células sustentaculares envolviendo los elementos vasculares, pero éstas podrían ser consideradas como una variación de las células que cubren a los capilares (Narbaitz, 1977).

El lumen de los espacios vasculares es un espacio único, interrumpido por columnas cilíndricas a través de todo el epitelio, es por esto que, más que formarse una red vascular, se conforma un seno vascular; las columnas están constituidas por varios tipos celulares (Narbaitz, 1977).

Se considera que la MCA tiene tres funciones principales: 1) ser el soporte de los capilares respiratorios extraembrionarios manteniéndolos directamente bajo la membrana del cascarón, 2) formar parte del saco alantoico encargado de coleccionar los productos de la excreción durante el desarrollo embrionario, y 3) llevar a cabo funciones de transporte para el balance de agua y de electrolitos en el embrión; más específicamente, el movimiento de sodio, cloruro y agua por el epitelio alantoico y la transferencia del calcio liberado desde el cascarón hacia la circulación embrionaria, a través del epitelio coriónico. Ambos procesos se

llevan a cabo mediante transporte activo (Coleman y Terepka, 1972; Dunn y Fitzharris, 1987; Akins y cols., 1993b).

El embrión de pollo cuenta con dos reservas de calcio durante el desarrollo, el vitelo es la primera reserva utilizada para obtener este elemento necesario para la calcificación esquelética hasta el día 12 aproximadamente, mientras que la segunda reserva la constituye el cascarón, que juega un papel importante en la homeostasis embrionaria del calcio (Tuan, 1987).

El transporte de calcio desde el cascarón a través de la MCA se inicia alrededor de los 10 días de incubación y continúa hasta el nacimiento, presentándose un pico de absorción a los 17 días y aportando aproximadamente el 80% del calcio requerido para el desarrollo del embrión (Clark y Simkiss, 1980; Akins y Tuan, 1993a); el proceso de transporte activo que se lleva a cabo para esta función es dependiente de sodio externo, es unidireccional y específico para el calcio (Tuan, 1980).

Elaroussi y DeLuca en 1994, demostraron que la falta de vitamina D en la dieta de la codorniz ponedora, resultó en una natalidad nula, siendo así que el transporte de calcio depende directamente de la presencia de esta vitamina; esto también fue demostrado por Scanes y cols., en 1987. Por otro lado, la deficiencia en vitamina K sólo reduce ligeramente la movilización de calcio a partir del cascarón (Elaroussi y DeLuca, 1994).

No se sabe con certeza si las células encargadas del transporte de calcio son las células de la cavidad vellosa o las células que cubren a los capilares (Narbaitz, 1987). Se han descrito vesículas que contienen esta sustancia tanto en las

células de la cavidad vellosa como en las células que cubren los capilares (Dunn y Fitzharris, 1987), que muestran una pinocitosis activa en las células endoteliales que forman el piso del seno vascular y rodean las columnas de los espacios vasculares (Narbaitz y Tellier, 1974; Narbaitz, 1977).

ANALOGÍA ENTRE LA MCA Y LA PLACENTA

Se ha sugerido que existe cierta analogía entre la MCA y la placenta de los mamíferos, debido a que ambas estructuras aseguran el intercambio respiratorio entre el feto y su entorno, aunque esta analogía debe usarse con cuidado, puesto que la placenta probablemente asegure más funciones metabólicas que la MCA (Ar y cols., 1987).

Tanto la placenta como el feto de los mamíferos conforman la unidad fetoplacentaria; ambos sintetizan y metabolizan hormonas esteroides de forma complementaria pues carecen de algunas de las enzimas involucradas en su síntesis (Solomon, 1994); además, para que la placenta pueda llevar a cabo sus funciones esteroidogénicas, depende de precursores que llegan tanto de la circulación materna como de la fetal (Jaffe, 1991).

Aun en etapas tempranas del desarrollo, el blastocisto humano tiene la capacidad de producir progesterona (P_4) y andrógenos, así como estrógenos (Solomon, 1994). La placenta temprana sintetiza hormonas esteroides, principalmente a partir del colesterol y de la dehidroepiandrosterona (DHEA) (Schubert y Schade, 1977; Solomon, 1994); también fue demostrada por Dupont y cols. (1991) la actividad de la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -

HSD). En una etapa más tardía además, se observa una clara actividad de las enzimas 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^5 - 4 isomerasa (3β -HSD), 19-hidroxilasa, sulfatasa, aromatasa y una actividad limitada de reductasa (Solomon, 1994; Schubert y Schade, 1977).

Por otra parte, en el blastocisto de pollo se ha demostrado la presencia de las enzimas 17α -hidroxilasa, C 17 , 20 -liasa, 3β -HSD, 3α -HSD, 17β -HSD, 5α y 5β -reductasa (Antila y cols., 1984).

Aun cuando la actividad metabólica en relación a la síntesis de hormonas esteroideas de la MCA de pollo no es bien conocida, recientemente se ha demostrado que esta membrana cataliza *in vitro* la conversión de cortisol a 20β -dihidrocortisol, lo que indica la presencia de la 20β -cetoesteroide reductasa en la fracción citosólica de este tejido (McNatt y cols., 1992).

ESTEROIDOGÉNESIS

Los esteroides son un grupo de lípidos que tienen como base de su estructura química un hidrocarburo cíclico, el ciclopentanoperhidrofenantreno (o anillo esteroide), que consta de diecisiete átomos de carbono que se disponen formando tres ciclohexanos y un ciclopentano. Los átomos de carbono se numeran de forma convencional del 1 al 17 y los anillos se nombran de la A a la D (Figura 2). La designación α indica que un sustituyente está orientado por debajo del plano del papel y se representa con una línea discontinua, mientras que β señala que se orienta por encima del mismo plano y se indica por medio de una línea gruesa.

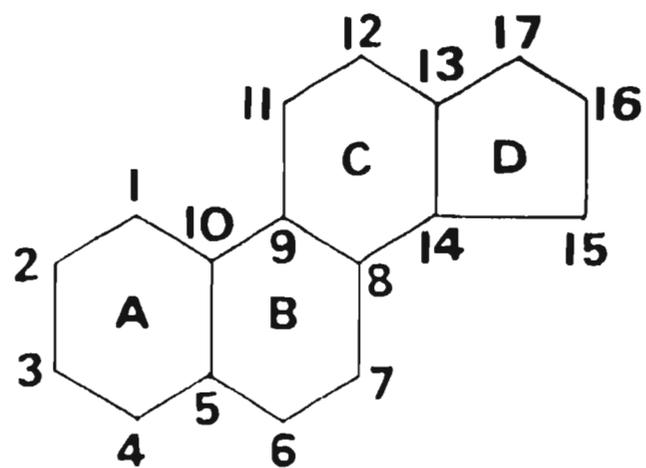


Figura 2. Estructura química del ciclopentanoperhidrofenantreno, configuración básica de las hormonas esteroides. Los anillos se designan de la A a la D y los carbonos en el orden de numeración indicado en la figura.

Las variaciones conformacionales les dan diferentes actividades biológicas a los esteroides (Hicks y Díaz-Zagoya, 1988).

Las hormonas esteroides pueden ser clasificadas conforme a su estructura química o a su actividad biológica principal; de acuerdo con la primera, hay varias estructuras hidrocarbonadas cíclicas que son utilizadas para su nomenclatura, estas son: (Figura 3)

Colestano: consta de 27 carbonos, tiene una cadena lateral de 6 carbonos unida al C-20; tiene dos grupos metilo en C-10 y C-13; es la estructura básica del colesterol, precursor común de todas las hormonas esteroides.

Pregnano: está constituido por 21 carbonos encontrándose un grupo etilo unido al C-17 y dos metilos en C-10 y C-13 tienen actividad progestacional.

Androstano: formado por 19 carbonos con dos metilos, en las posiciones C-10 y C-13 y sin cadena lateral; es el grupo de las hormonas esteroides que tienen actividad androgénica.

Estrano: es una estructura de 18 carbonos con un grupo metilo en el C-13 y sin cadena lateral; constituye la estructura básica de los estrógenos.

Con base en su actividad biológica, las hormonas esteroides se clasifican en cinco grupos, que son: 1) Progestinas naturales, 2) Glucocorticoides, 3) Mineralocorticoides, 4) Andrógenos y 5) Estrógenos (Hicks y Díaz-Zagoya, 1988).

Las hormonas esteroides naturales tienen una función esencial en la regulación de muchos procesos biológicos. Su síntesis se lleva a cabo principalmente en algunas glándulas de secreción

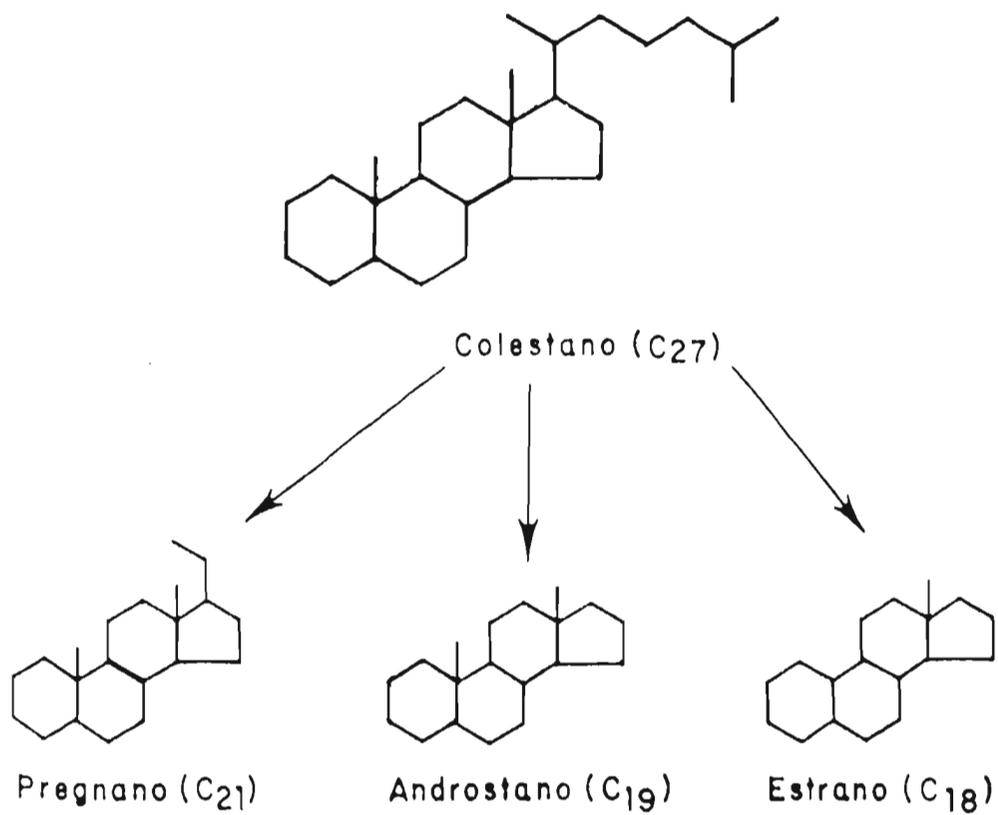


Figura 3. Ciclos de carbono que constituyen la estructura química básica de las hormonas esteroides. En el paréntesis se indica el número de carbonos que las conforman.

interna, como son las glándulas suprarrenales, el testículo, el ovario, la placenta y el hígado fetal (ElAttar y Dirscherl, 1965; Gibbs y cols., 1978; Hicks y Díaz-Zagoya, 1988). Los precursores esteroides como la pregnenolona (P_5), y sus intermediarios como la DHEA, son secretados por alguna de esas glándulas y convertidos a su forma activa en diversos tejidos periféricos (O'Malley y Strott, 1991).

Las hormonas esteroides son producidas a partir del colesterol mediante una serie sucesiva de reacciones enzimáticas. El colesterol necesario para la biosíntesis puede ser obtenido de tres fuentes alternativas: a) tomado de la circulación sanguínea, b) tomado a partir de reservas intracelulares o formando parte de membranas celulares, o c) sintetizado *de novo* a partir del metabolismo celular. La utilización de estas diversas fuentes depende del tipo celular y de las condiciones fisiológicas prevalecientes (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

Para que se realice la biosíntesis de estas hormonas se requiere la presencia de algunas enzimas esenciales, como son:

La 17α -hidroxilasa ($P450_{C17}$), es también un citocromo P450 que tiene la función de hidroxilar en la posición 17; este citocromo posee una segunda función que consiste en cortar la unión C-C entre los carbonos 17 y 20, acción enzimática llamada $C17,20$ -liasa o $C17,20$ -desmolasa; ésta es una enzima microsomal localizada en la corteza suprarrenal y en las gónadas, que requiere NADPH como cofactor.

Se sabe que la enzima 3β -HSD está constituida por una sola proteína, que realiza las funciones de deshidrogenación de

esteroides en la posición 3β (3β -hidroxi), así como la isomerización del grupo Δ^5 -3-ceto al grupo Δ^4 -3-ceto (Inano y cols., 1990; Hall, 1994). Estas funciones no son mutuamente separables. La enzima fue localizada en la fracción microsomal derivada del retículo endoplásmico y en la membrana mitocondrial (Simard y cols., 1993). También se demostró que para la función de deshidrogenación, la enzima 3β -HSD requiere del NAD^+ como cofactor, mientras que para la de isomerización necesita del NADH como cofactor (Inano y cols., 1990).

La 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD), es una enzima microsomal que puede utilizar NAD^+ ó NADP^+ como cofactores (Vallet-Strouve y cols., 1983), es reversible y su sentido depende de la presencia de sustrato o de la acumulación del producto (Hall, 1994).

La 5α -reductasa es una enzima que transforma de manera irreversible y selectivamente un 4-en-3-cetoesteroide a su correspondiente 5α -3-cetoesteroide (por ejemplo de testosterona a 5α -dihidrotestosterona); para realizar esta función requiere la presencia de NADPH y su localización es esencialmente microsomal.

Aromatasa. Este es un complejo enzimático que forma parte de una familia de enzimas, los citocromos P450, que tienen como función principal la de hidroxilar sustratos liposolubles de los que se obtienen productos más solubles en agua; también llevan a cabo rupturas de uniones C-C. La aromatasa ($\text{P450}_{\text{arom}}$) es un complejo enzimático microsomal con la capacidad de hidroxilar en C-19, eliminar el grupo metilo unido a C-10 y conferirle al anillo A una estructura aromática.

La biosíntesis de hormonas esteroides requiere de un paso básico que es la conversión de colesterol a P_5 , estructura de 21 carbonos; consiste en la ruptura de la unión entre los carbonos 20 y 22, eliminándose así la cadena lateral. Esta reacción está mediada por el citocromo $P450_{\text{SCC}}$ (cholesterol side-chain cleavage) y se lleva a cabo en la cara interna de la membrana interna de las mitocondrias de las células esteroideogénicas (Gore-Langton y Armstrong, 1988; O'Malley y Strott, 1991).

La pregnenolona es el intermediario fundamental de todas las clases de esteroides hormonales producidos en tejidos esteroideogénicos; a partir de esta hormona se originan las dos vías básicas a través de las cuales se sintetizan todos los esteroides hormonalmente activos. La pregnenolona puede ser transformada a progesterona (P_4) mediante la enzima 3β -HSD; a partir de P_4 se origina la vía de síntesis de hormonas esteroides conocida como Δ^4 (ó 4-en), mientras que la utilización de la P_5 como precursor da lugar a la vía Δ^5 (ó 5-en), con la participación del complejo enzimático 17α -hidroxilasa/ $C17,20$ -liasa (Figura 4). Los principales productos son DHEA a partir de P_5 , y androstendiona (A_4) desde P_4 . En un paso posterior, la A_4 es convertida a testosterona (T) por la acción de la 17β -HSD y tanto A_4 como T pueden ser aromatizadas a estrógenos por la aromatasa.

Después de ser secretadas al torrente circulatorio, las hormonas esteroides se unen a proteínas de transporte hidrosolubles, a través de las cuales llegan a sus órganos blanco, donde se separan de esta proteína, por lo que pueden atravesar la membrana plasmática fácilmente (Alberts y cols., 1992).

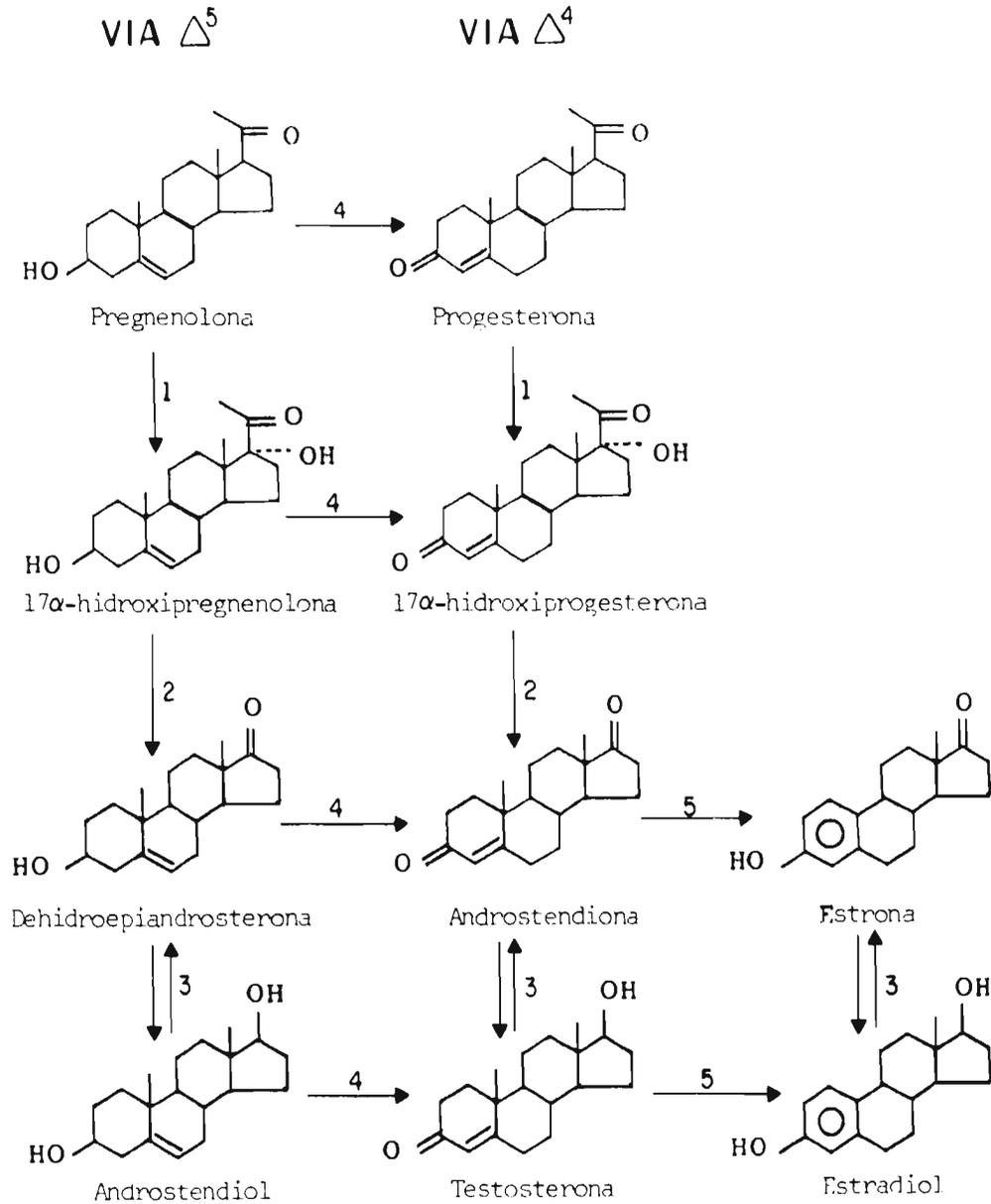


Figura 4. Vías Δ^4 y Δ^5 para la biosíntesis de hormonas esteroides a partir de pregnenolona. Los números indican las enzimas involucradas: 1) 17 α -hidroxilasa; 2) C17,20-liasa; (1 y 2 son dos funciones distintas del citocromo P450_{C17}); 3) 17 β -HSD; 4) 3 β -HSD y 5) aromatasa.

En las células de los órganos blanco se encuentran los receptores a hormonas esteroides; son proteínas celulares que existen en bajas cantidades, pero que unen específicamente y con gran afinidad a dichas hormonas. Cuando una de ellas se une a su receptor, éste experimenta un cambio conformacional que lo activa. Los receptores tienen tres funciones importantes, que son: a) unirse a su hormona correspondiente; b) unirse a DNA; y c) formando el complejo hormona-receptor, regular la transcripción genética; esto indica que los receptores deben tener tres tipos de dominios funcionales, uno que se une a la hormona esteroide y regula la activación funcional del receptor, uno que se enlaza al DNA y otro dominio que modula la transcripción (O'Malley y Strott, 1991).

INTRACRINOLOGÍA Y LOCALIZACIÓN DE 3 β -HSD EN TEJIDOS PERIFÉRICOS

Por medio de la actividad intrácrina de los tejidos periféricos, los andrógenos y los estrógenos producidos localmente ejercen su acción en las mismas células en donde se llevó a cabo su síntesis; de esta manera se establece un control autónomo de la esteroidogénesis por lo que los tejidos son capaces de ajustar la formación y el metabolismo de esteroides sexuales de acuerdo a los requerimientos locales, evitando así su liberación y su efecto en otros tejidos (Rhéaume y cols., 1991; Labrie y cols., 1994).

La actividad intrácrina es un sistema económico que requiere de pequeñas cantidades de hormonas para llevar a cabo su función óptima en los tejidos periféricos (Rhéaume y cols., 1991); esto podría estar relacionado con los niveles más altos de sustratos endógenos que se encuentran en los tejidos esteroidogénicos

clásicos (Simard y cols., 1995).

En los primates superiores, tanto los andrógenos como los estrógenos son en gran parte, o con frecuencia, completamente sintetizados en tejidos periféricos; esto difiere de lo que sucede en otros mamíferos, que generalmente son utilizados como animales de laboratorio, en los que la producción de hormonas esteroides está limitada a las gónadas (Labrie y cols., 1994; Labrie y cols., 1995).

Se ha visto que después de la castración en hombres adultos, los niveles de dehidroepiandrosterona prostática y de los metabolitos de los andrógenos de la circulación general, están disminuidos al 50%, esto indica que una proporción importante de estos andrógenos es de origen extratesticular, siendo sintetizados en tejidos periféricos a partir de DHEA y su sulfato; en las mujeres se calcula que el 75% de los esteroides sexuales se producen en tejidos periféricos, pero después de la menopausia, esta cantidad se eleva al 100% (Labrie y cols., 1995).

Como ya se mencionó, la enzima 3β -HSD es esencial en la conversión de los esteroides 5-pregnen- 3β -ol y 5-androsten- 3β -ol en sus correspondientes Δ^4 -3-cetoesteroides, lo cual constituye un paso básico en la biosíntesis de todas las hormonas esteroides biológicamente activas (glucocorticoides, mineralocorticoides, progestágenos, andrógenos y estrógenos) (Clarke y cols., 1993; Simard y cols., 1993; Greco y Payne, 1994).

Analizando la actividad de la enzima 3β -HSD mediante la conversión de DHEA en androstendiona en el mono Rhesus, Martel y cols. (1994) reportaron que la mayor tasa de transformación se

encuentra en los tejidos esteroidogénicos clásicos; sin embargo, de los 25 diferentes órganos estudiados por estos autores, algunos de ellos poseen una actividad moderada de esta enzima, entre éstos se encuentran el hígado, la próstata y la hipófisis. Otros órganos mostraron tener una menor actividad enzimática, entre ellos están los intestinos grueso y delgado, el tejido graso mesentérico, el músculo esquelético y las glándulas salivales. Fueron muy pocos los órganos en los que no fue detectada la presencia de dicha enzima, como ejemplos están el bazo, el cerebelo y el cerebro, además de que hubo una diferencia de expresión en relación al sexo.

La actividad de la enzima 17β -HSD, de la 5α -reductasa y la aromatasa también se encontró en varios tejidos periféricos, lo que comprueba la función esteroidogénica periférica de los mismos (Martel y cols., 1994).

Se han descrito dos actividades de la enzima 17β -HSD, una androgénica, que cataliza la conversión entre A_4 y T y otra estrogénica, que convierte reversiblemente estradiol (E_2) y estrona (E_1) (Hall, 1994; Martel y cols., 1994). Además han sido localizados tres diferentes genes que codifican para distintas isoenzimas (Labrie y cols., 1995). La actividad y localización de las isoformas de esta enzima está en relación con su requerimiento, de modo que hay mayor actividad androgénica en testículo y otros órganos masculinos, mientras que la estrogénica se encuentra sobre todo en ovario entre otros tejidos femeninos (Martel y cols., 1994).

Mendoza-Hernández y cols. (1988), estudiando la actividad enzimática en las mitocondrias del páncreas del perro, encontraron

la transformación entre A_4 y T, la cual está dada por la enzima 17β -HSD; más adelante, Mendoza-Hernández y cols. (1990) demostraron la presencia de la 3β -HSD en el mismo órgano, a través del metabolismo de DHEA y P_5 .

ISOFORMAS DE 3β -HSD

En los mamíferos, las diferentes isoenzimas de la 3β -HSD se expresan tanto en tejidos esteroideogénicos clásicos como en los tejidos periféricos (Lachance y cols., 1990; Simard y cols., 1993; Labrie y cols., 1994). La presencia de estas isoenzimas en los tejidos periféricos permite la transformación local de los precursores esteroides inactivos provenientes de las suprarrenales, principalmente DHEA y su sulfato, en esteroides activos (Rhéaume y cols., 1991; Labrie y cols., 1994; Lachance y cols., 1990; Labrie y cols., 1995; Simard y cols., 1995).

Algunos autores (Martel y cols., 1994) aseguran que los primates y los humanos son los únicos en poseer glándulas suprarrenales, que proveen a los órganos periféricos de los precursores esteroides, DHEA y de su sulfato; a partir de éstos son producidos tanto andrógenos como estrógenos.

En el ratón, se han identificado varias isoenzimas para la 3β -HSD, de las cuales la tipo I se expresa solamente en los tejidos esteroideogénicos, mientras que los tipos II y III se localizan en el riñón y el hígado (Bain y cols., 1991; Clarke y cols., 1993; Payne y cols., 1995). Estos últimos autores aislaron una cuarta isoenzima que se expresa solamente en el riñón, y una quinta forma de la enzima encontrada únicamente en el hígado del macho adulto,

que parece ser homóloga al tipo III.

Diferentes tipos de la 3β -HSD han sido encontrados también en la rata. Las isoformas I y II se expresan en las glándulas suprarrenales, el ovario, el testículo, el riñón y el tejido adiposo; el tipo II tiene mayor expresión que el tipo I; la isoenzima tipo IV está involucrada en la deshidrogenación y la isomerización de los Δ^5 - 3β -hidroxiesteroides y se ha localizado exclusivamente en la piel (Simard y cols., 1993). En un estudio realizado por Ogunranti (1992) encuentra en el ámpula del oviducto de rata la mayor actividad de la 3β -HSD. Por otra parte, existe un dimorfismo sexual en la expresión de la 3β -HSD en el hígado de rata y de hamster (Rogerson y cols., 1995). También se identificó la actividad de esta enzima en las células de la mucosa gástrica de la rata (Le Goascogne y cols., 1995).

En el hamster se encontraron altos niveles de RNAm para la 3β -HSD en las suprarrenales, moderados niveles en el riñón y bajos en el testículo y el ovario, mientras que en el hígado hay un dimorfismo sexual para la expresión de la enzima; las isoenzimas tipo I y II tienen las actividades de deshidrogenasa/isomerasa y 3-cetoesteroide reductasa y se encuentran en la suprarrenal y el riñón, mientras que el tipo III, que se localizó en el hígado, sólo tiene la segunda de estas funciones (Rogerson y cols., 1995).

En el humano, Lachance y cols. (1990) postulan la existencia de una o de varias enzimas responsables de la oxidación de los esteroides pregnano y androstano; la expresión de la isoenzima tipo I predomina en la placenta y en tejidos periféricos (como la piel), mientras que el tipo II es casi exclusivo de las suprarrenales y

las gónadas (Simard y cols., 1993; Labrie y cols., 1995). La Km de la 3 β -HSD tipo II es más alto que el del tipo I, lo que está relacionado con una menor cantidad de sustratos en los tejidos periféricos (Labrie y cols., 1994).

En general, se acepta que las distintas isoformas de la 3 β -HSD son producto de diferentes genes y no variaciones de uno solo; estos genes al parecer han evolucionado de un único gen ancestral (Simard y cols., 1995). En el ratón están localizados en el cromosoma 3, mientras que en el humano se encuentran en el brazo corto del cromosoma 1 (Payne y cols., 1995)

Existe un deterioro en la formación de esteroides en las suprarrenales y en las gónadas de los pacientes con deficiencia clásica de la 3 β -HSD, esto es el resultado de una o más mutaciones en el gen de la isoenzima 3 β -HSD del tipo II, causando así varios niveles de daño en la actividad enzimática; sin embargo, en los pacientes con este tipo de deficiencia, se ha encontrado que tienen un desarrollo, aparentemente normal, de los signos de la pubertad, por lo que se deduce que poseen una 3 β -HSD tipo I con actividad normal (Labrie y cols., 1994; Labrie y cols., 1995). En el ratón, la 3 β -HSD periférica también puede jugar un papel importante en la esteroidogénesis en el caso de que exista una deficiencia clásica gonadal (Payne y cols., 1995).

En los órganos periféricos como el hígado, el riñón y la piel, la 3 β -HSD es modulada de una manera muy importante por la prolactina, los andrógenos, las hormonas tiroideas y los glucocorticoides; además esta regulación es específica para cada tejido periférico, lo que permite un control más preciso de la

función, según las necesidades locales (Labrie y cols., 1995). Previamente Genti-Raimondi y cols. (1989), habían demostrado que la progesterona, el estradiol y la testosterona principalmente, son inhibidores competitivos de la 3β -HSD al reprimir la conversión de pregnenolona a progesterona, cuando se combinan con el sitio activo de la enzima. Por otra parte, Payne y Sha (1991), encuentran que el AMPc es esencial para la expresión máxima del RNAm de la 3β -HSD en el ratón; y Tonetta y cols. (1987), sostienen que la hCG es un amplificador biológico de la actividad de la 3β -HSD.

JUSTIFICACIÓN

Se sabe que la membrana corioalantoidea lleva a cabo importantes funciones metabólicas durante el desarrollo del embrión de pollo. También se sabe que hay cierta analogía entre esta membrana y la placenta de los mamíferos pues ambas son capaces de proveer un adecuado intercambio respiratorio para el organismo en desarrollo. Por otra parte McNatt y cols. en 1992, encontraron que la MCA tiene la capacidad de convertir el cortisol a 20β -dihidrocortisol *in vitro*, por lo que se dedujo la presencia de la enzima 20β -cetoesteroide reductasa en esta membrana. Sin embargo, hasta la fecha no parecen haber más evidencias sobre el metabolismo de esteroides en la MCA. Por lo anterior se considera importante conocer un poco más acerca de la capacidad funcional de la MCA, particularmente en lo referente al metabolismo de hormonas esteroides. Con base en esto se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

General:

Investigar si las células de la MCA del embrión de pollo tienen la capacidad de metabolizar esteroides sexuales.

Particulares:

1. Identificar la actividad de enzimas relacionadas con la síntesis de hormonas esteroides, a partir del metabolismo de DHEA y de P_5 .

2. Indagar si el metabolismo de esteroides en la MCA cambia con respecto a la edad embrionaria.

3. Establecer si existen diferencias sexuales en el metabolismo de hormonas esteroides en la MCA.

HIPÓTESIS

Sabiendo que existe cierta analogía funcional entre la MCA del embrión de pollo y la placenta de los mamíferos, la MCA tiene la capacidad de metabolizar esteroides sexuales, por lo que cuenta con enzimas que participan en la síntesis y biotransformación de estas hormonas, durante el desarrollo embrionario del pollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los esteroides radiactivos: [1,2,6,7-³H(N)]-dehidroepiandrosterona (actividad específica de 89.8 Ci/mmol), [7-³H(N)]-pregnenolona (23.5 Ci/mmol) y [1,2,6,7-³H(N)]-androst-4-en-3,17-diona (93.0 Ci/mmol), fueron adquiridos de Du Pont Co. NEN Research Products (Boston, MA) y repurificados previamente a su uso, mediante cromatografía en capa fina, sobre cromatoplasmas de vidrio. Los diferentes esteroides utilizados como estándares fríos fueron pregnenolona (P₃), 17 α -hidroxipregnenolona (17 α OHP₃), progesterona (P₄), 17 α -hidroxiprogesteroa (17 α OHP₄), dehidroepiandrosterona (DHEA), testosterona (T), androstendiona (A₄), androstendiol (Δ^5 -diol), 5 β -androstendiona (5 β -diona), estrona (E₁) y estradiol (E₂); estos esteroides fueron adquiridos de Steraloids (Wilton, NH). Los cromatofolios de aluminio con sílica gel G-60, con indicador fluorescente F₂₅₄ y los de vidrio sin indicador fluorescente, fueron obtenidos de Merck (México).

Los solventes utilizados fueron de grado analítico.

El medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y la tripsina se adquirieron de Grand Island Biological Co. (Grand Island, NY). El inhibidor de tripsina de soya y la albúmina sérica bovina fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO).

MÉTODOS

Obtención de material biológico

Se utilizaron embriones de pollo de la raza White Leghorn (Babcock B-300) obtenidos de la granja de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Se obtuvo la MCA de embriones de 9 a 17 días de edad embrionaria, la misma se verificó mediante las tablas de clasificación de Hamburger y Hamilton (1951). La MCA se colocó en solución salina balanceada, libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (SSB). Con ayuda del microscopio estereoscópico se cortó en trozos de aprox. 5 X 5 mm y se eliminaron los vasos sanguíneos más prominentes. Para disgregar enzimáticamente las células el tejido de cada embrión, se colocó en un vial con 3 ml de tripsina al 0.1 % en SSB libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , y se incubaron los viales durante 15 a 25 minutos, en baño con agitación constante (90 ciclos/minuto), a 37°C. La disociación celular se completó mecánicamente con ayuda de pipetas de vidrio. Se detuvo la reacción agregando 3 ml de inhibidor de tripsina al 0.2 % en Medio Mínimo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) mas albúmina sérica bovina al 0.1 %.

La suspensión celular se hizo pasar por una malla de nylon con el fin de eliminar los restos de tejido, se colectó en tubos de centrifuga y se hicieron dos lavados de 10 minutos cada uno a 1,500 rpm, resuspendiendo el botón celular en DMEM.

Se realizó un conteo celular con ayuda de un hemocitómetro y se realizó la prueba de exclusión del azul tripano (agregando un volumen igual al medio) para verificar la viabilidad de las células. No se

consideraron los eritrocitos, que son fáciles de reconocer por su forma ovoide y su superficie lisa. Las células de la MCA se identificaron por ser redondeadas, con el núcleo bien definido y por presentar una superficie rugosa; estas células no forman cúmulos. No se distinguen tipos celulares.

La viabilidad celular de la suspensión estuvo por arriba del 90%.

Metabolismo de hormonas esteroides

Se colocaron 5×10^5 células de la MCA en DMEM, alcanzando un volumen de 0.990 ml; se agregó después el precursor radiactivo correspondiente: DHEA, P₅ ó A₄ (aprox. 100,000 cpm/vial), en 10µl de etanol, para completar un volumen total de 1ml. La incubación se realizó durante 15 ó 60 minutos a 37°C, en baño con agitación constante.

Para detener la reacción al término de la incubación, se agregaron 10 ml de éter etílico frío/vial, y se agitaron con vórtex durante 20 segundos para realizar la extracción de los esteroides desde la fase acuosa (medio y células), a la orgánica (éter). Se congelaron las muestras a -45°C vertiendo la fase orgánica a otro vial y evaporándola a sequedad, a 40°C aproximadamente; se realizaron tres extracciones en cada muestra utilizando cada vez 10 ml de éter y agitando con vórtex durante 20 segundos.

Separación de metabolitos

La separación de los esteroides se realizó mediante cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de aluminio con sílica gel. Se

colocaron los estándares de los esteroides auténticos como acarreadores y para referencia (aprox. 10 µg). Las muestras problema se resuspendieron en 100 µl de etanol, aplicando 40 µl en el carril correspondiente del cromatofolio (aprox. 50,000 cpm).

Las cromatografías se desarrollaron en diferentes sistemas de disolventes, dependiendo del precursor radiactivo aplicado en cada caso. Para la separación de los metabolitos de DHEA se utilizaron diclorometano: acetato de etilo, 6:4 (v/v), y éter isopropílico: hexano: ácido acético, 70:30:2 (v/v/v), mientras que para los metabolitos de P₃ se emplearon diclorometano: acetato de etilo, 8:2 (v/v) y éter etílico: hexano, 3:1 (v/v). En este último sistema se desarrolló dos veces la cromatografía. Los estándares fueron revelados mediante luz ultravioleta y con ácido sulfúrico al 10 % calentando a 120°C. De acuerdo con la localización de los estándares auténticos, la placa de cromatografía se cortó en fracciones, y cada una fue colocada en un vial al que se le agregaron 5 ml de líquido de centelleo para cuantificar la radiactividad, con la utilización de un contador de centelleo líquido (Beckman LS-6000). Una vez obtenida la lectura de las cuentas por minuto (cpm), se calculó el porcentaje de transformación para todos los metabolitos identificados. El porcentaje de recuperación de la radiactividad fue superior al 85%.

Recristalización

Para corroborar la identidad de algunos de los principales metabolitos, se realizaron incubaciones celulares de MCA sembrando 5 X 10⁵ células y añadiendo alrededor de 300,000 cpm de los esteroides

marcados radiactivamente. El tiempo de incubación fue de 15 ó 60 minutos, deteniendo a su término la reacción con éter frío. Las extracciones se hicieron como se indicó anteriormente.

En tubos de vidrio de los que se conocía el peso, se colocaron de 15 a 30 mg del estándar correspondiente al metabolito que se pretendía verificar; se disolvió cada esteroide calentando y agitando con vórtex, después de agregar el o los solventes adecuados (ver tablas de recristalización). Para cada caso se elaboró un control positivo y otro negativo.

La muestra problema se resuspendió en etanol y se agregó una alícuota de la muestra problema, que contuviera aproximadamente 100,000 cpm, a los tubos con los estándares fríos. Luego se agregó agua (sin rebasar el 50 % del volumen total de solventes) y se refrigeraron las muestras por un período mínimo de 24 horas, para facilitar la cristalización de los esteroides. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 3,000 rpm durante 20 minutos para separar el medio líquido (aguas madres) de los cristales, recuperando aquel con una micropipeta; de este modo se midió el volumen del sobrenadante y se pudo calcular su radiactividad. Los cristales se secaron en una estufa a 80°C durante, por lo menos, 24 horas; se pesaron para conocer la recuperación y se disolvieron nuevamente tomando una alícuota para medir la radiactividad. Las recristalizaciones se repitieron 5 veces para cada uno de los estándares.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante el análisis de varianza ANOVA y la prueba de Tukey con el paquete estadístico Statgraphics.

Para aceptar una diferencia estadísticamente significativa entre medias, se consideró una $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

METABOLISMO DE ESTEROIDES

Metabolismo de DHEA en la MCA

Cuando las células de la MCA fueron incubadas con DHEA tritiada como sustrato, durante 60 minutos, se encontró como principal producto a la A_4 ; ésta se produjo de manera constante en todas las edades exploradas (Tabla 1; Figura 5). Este compuesto se identificó al desarrollar la cromatografía con el sistema de disolventes diclorometano: acetato de etilo, 6:4 (v/v). Los menores porcentajes de transformación hacia este metabolito se presentaron en las edades más tempranas, pero se incrementó su proporción conforme aumentó la edad del embrión. Los valores oscilaron alrededor del 2% entre los 10 y los 12 días de edad embrionaria. Los porcentajes de transformación alcanzaron un 7.91% a los 13 días, 19.23% a los 15 y 16.38% a los 17 días de edad embrionaria.

Se detectó una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre los 13 días vs 10, 11 y 12 días, y de 15 y 17 vs 13 y vs las edades menores (Tabla 1).

Analizando la transformación de DHEA a A_4 , separando a los embriones por sexo, se vio que en las células de la MCA de la hembra la conversión fue aumentando respecto a la edad; el máximo porcentaje se dio a los 15 días de edad embrionaria para luego decrecer hacia los 17. En el macho, la transformación fue

Tabla 1. METABOLISMO DE DHEA EN CÉLULAS DE LA MCA
DE EMBRIONES DE AMBOS SEXOS (Promedio)

SUSTRATO/ metabolito	PORCENTAJE DE TRANSFORMACIÓN POR EDAD (Días)					
	10	11	12	13	15	17
DEHIDROEPI- ANDROSTERONA						
Androstendiona	2.76 ^a ± 7.19	2.10 ^a ± 4.12	1.77 ^a ± 1.99	7.91 ^b ± 6.37	19.23 ^c ± 15.54	16.38 ^c ± 9.44
Androstendiol	7.81 ^a ± 9.62	5.41 ^a ± 5.94	7.62 ^a ± 6.60	6.73 ^a ± 12.52	4.43 ^a ± 4.25	2.69 ^a ± 1.77
% de DHEA remanente	67.15 ± 15.41	72.93 ± 10.58	74.38 ± 9.96	68.59 ± 16.09	60.86 ± 21.62	65.55 ± 10.29

Sistema de disolventes utilizado: diclorometano: acetato de etilo, 6:4 (v/v).

Los valores representan la media ± la desviación estándar de n=12 para 10 días y n=16 para el resto de los datos.

Superíndices diferentes indican valores estadísticamente significativos entre los grupos.

Transformación de DHEA a A4

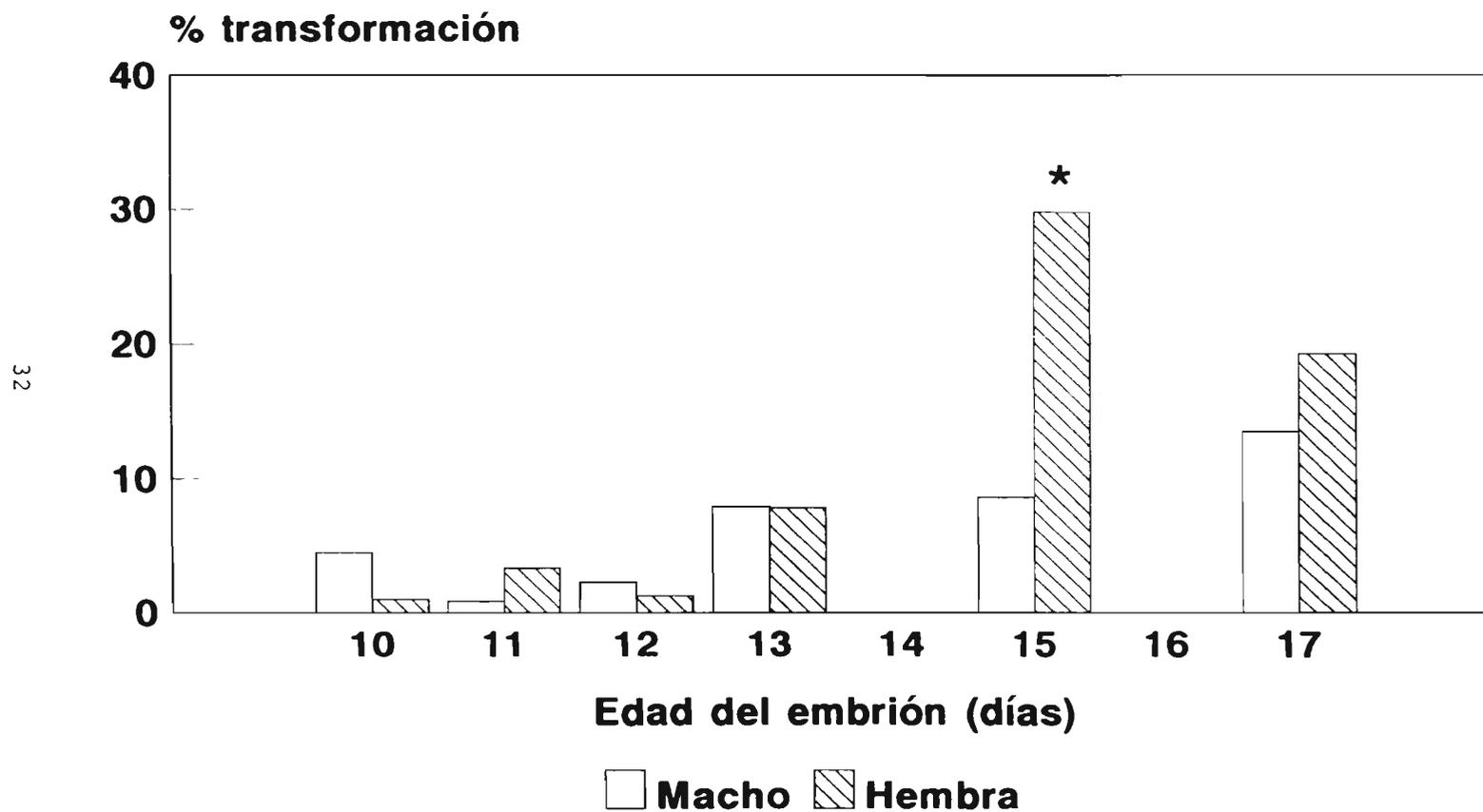


Figura 5. Porcentajes de transformación de DHEA a A en embriones hembra y macho a diferentes edades. Las barras representan la media de n=12 (10 días) ó n=16 (*) representa una diferencia significativa entre los datos obtenidos para cada sexo

incrementando paulatinamente en relación al aumento de la edad del embrión, observándose el máximo porcentaje a los 17 días (13.47%) (Tablas 2 y 3). La transformación hacia A_4 es significativamente mayor en las hembras que en los machos a los 15 días, sin observarse diferencias en las otras edades (Figura 5).

Un segundo metabolito encontrado a partir de DHEA fue Δ^5 -diol, con porcentajes de transformación menores al 10% en promedio. Sin embargo, se observó como un metabolito producido de manera constante; la mayor proporción de transformación se detectó entre los 10 y los 13 días de incubación, con una producción máxima a los 12 días (7.82%) (Tabla 1; Figura 6). Al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas comparando entre las diferentes edades, ni al contrastar ambos sexos.

Se encuentran resultados similares cuando las cromatografías fueron desarrolladas con el sistema de separación éter isopropílico: hexano: ácido acético, 70:30:2 (v/v/v).

La identidad de los metabolitos A_4 y Δ^5 -diol fue confirmada a través de las recristalizaciones sucesivas con estándares fríos (Tabla 4).

Metabolismo de Pregnenolona en la MCA

Se analizó la producción de esteroides a los 13, 15 y 17 días de edad embrionaria, utilizando P_3 tritiada como precursor.

Tabla 2. METABOLISMO DE DHEA EN CÉLULAS DE LA MCA
DE EMBRIONES HEMBRA (Promedio)

SUSTRATO/ metabolito	PORCENTAJE DE TRANSFORMACIÓN POR EDAD (Días)					
	10	11	12	13	15	17
DEHIDROEPI- ANDROSTERONA						
Androstendiona	0.99 ^a ± 1.84	3.34 ^{ab} ± 5.43	1.26 ^{ab} ± 1.01	7.87 ^{bc} ± 5.66	29.82 ^{bc} ± 15.21	19.30 ^c ± 11.10
Androstendiol	11.55 ± 12.07	4.99 ± 3.15	7.87 ± 6.45	9.81 ± 16.71	6.41 ± 4.68	2.14 ± 1.50
% de DHEA remanente	67.68 ± 18.68	73.01 ± 10.95	74.92 ± 7.64	65.88 ± 15.49	47.51 ± 22.88	63.23 ± 11.32

Sistema de disolventes utilizado: diclorometano: acetato de etilo, 6:4 (v/v).

Los valores representan la media ± la desviación estándar de n=6 para 10 días y n=8 para el resto de los datos.

Superíndices diferentes indican valores estadísticamente significativos entre los grupos.

Tabla 3. METABOLISMO DE DHEA EN CÉLULAS DE LA MCA
DE EMBRIONES MACHO

SUSTRATO/ metabolito	PORCENTAJE DE TRANSFORMACIÓN POR EDAD (Días)					
	10	11	12	13	15	17
DEHIDROEPI- ANDROSTERONA						
Androstendiona	4.53 ^a ± 9.67	0.86 ^a ± 1.15	2.29 ^a ± 2.52	7.94 ^{ab} ± 7.01	8.65 ^{bc} ± 5.24	13.47 ^c ± 6.21
Androstendiol	4.06 ± 3.34	5.82 ± 7.77	7.76 ± 6.75	3.65 ± 3.92	2.44 ± 2.50	3.23 ± 1.84
% de DHEA remanente	66.62 ± 11.20	72.85 ± 10.21	73.85 ± 11.80	71.30 ± 16.22	74.22 ± 7.41	67.86 ± 8.52

Sistema de disolventes utilizado: diclorometano: acetato de etilo, 6:4 (v/v).

Los valores representan la media ± la desviación estándar de n=6 para 10 días y n=8 para el resto de los datos.

Superíndices diferentes indican valores estadísticamente significativos entre los grupos.

Transformación de DHEA a A5-diol

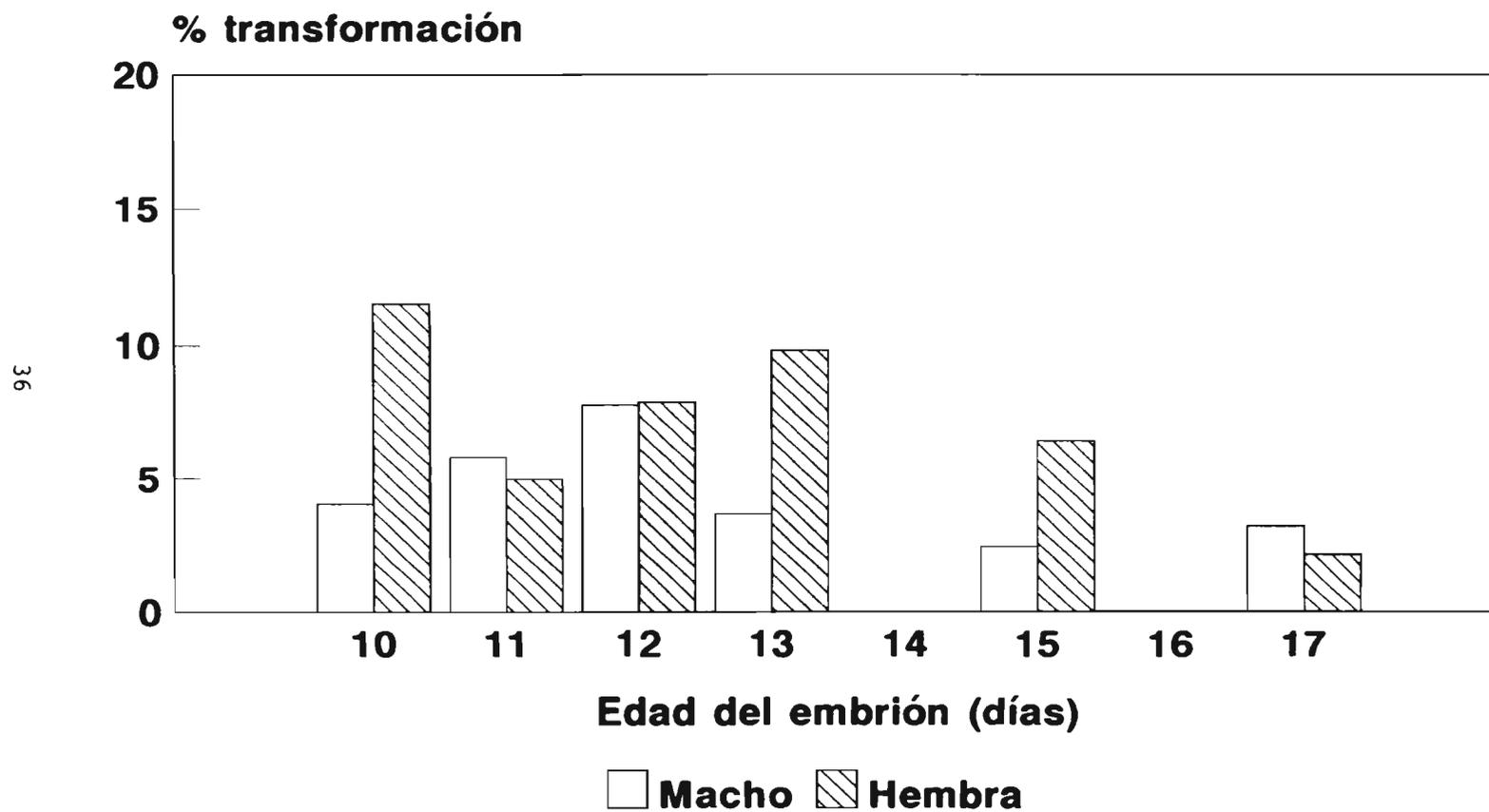


Figura 6. Porcentajes de transformación de DHEA a 5-diol en embriones hembra y macho a diferentes edades. Las barras representan la media de n=12 (10 días) ó n=16. No se observaron diferencias entre sexos.

Tabla 4. RECRISTALIZACIÓN A PARTIR DEL METABOLISMO DE DHEA

Metabolito	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (cpm/mg)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
HEMBRA						
Androstendiona	2,591.1	2,180.6	2,033.1	1,798.3	1,528.1	1,489.2
Δ^5 -androstendiol	2,533.1	2,061.0	1,434.9	1,284.5	1,142.0	1,139.0
DHEA	1,930.0	1,956.5	2,000.0	1,969.9	1,751.7	1,698.5
Colesterol	369.0	72.6	6.0	0.0	-	-
MACHO						
Androstendiona	2,605.5	2,056.9	1,944.9	1,759.3	1,570.1	1,532.3
Δ^5 -androstendiol	2,331.2	2,092.4	1,730.4	1,096.7	1,083.3	1,012.8
DHEA	2,797.9	2,541.8	2,493.4	2,461.1	2,339.5	2,317.3
Colesterol	259.4	63.3	1.8	0.0	-	-

C= cristalización. Edad de los embriones: 15 días.

Disolvente utilizado para A₄ y colesterol: etanol; para Δ^5 -diol y DHEA: metanol.

Los principales metabolitos encontrados luego de 60 minutos de incubación fueron la $17\alpha\text{OHP}_5$ y otro producto no identificado. Se detectó la máxima transformación a los 15 días de edad embrionaria con un 20.25%. No se observaron cambios significativos entre los porcentajes de transformación en estas edades. Tampoco se encontraron diferencias estadísticas al comparar la síntesis de este metabolito entre los dos sexos (Tabla 5).

El metabolito no identificado a partir de P_5 tuvo como máximo porcentaje de transformación 13.65 a los 13 días de edad embrionaria (Tabla 5). En el sistema de solventes diclorometano: acetato de etilo, 8:2 (v/v), este metabolito corrió con un $R_f=0.079$, mientras que en el sistema éter etílico: hexano, 3:1 (v/v), el $R_f=0.093$. El análisis estadístico no reflejó diferencias entre las distintas edades ni entre los sexos.

La incubación de células de la MCA en embriones de 15 días con P_5 tritiada, durante 15 minutos, también mostró la presencia de los dos metabolitos mencionados. La cromatografía fue desarrollada con éter etílico: hexano, 3:1 (v/v), como sistema de separación y como producto principal se identificó a la $17\alpha\text{OHP}_5$, con un porcentaje de conversión de 6.34. El otro producto derivado de la incubación con P_5 fue el metabolito no identificado y se obtuvo con un porcentaje de transformación del 6.0. (Tabla 7).

Tabla 5. METABOLISMO DE P₅ EN CÉLULAS DE LA MCA
DE EMBRIONES DE AMBOS SEXOS (PROMEDIO)

SUSTRATO/ metabolito	PORCENTAJE DE TRANSFORMACIÓN POR EDAD (días)		
	13	15	17
PREGNENOLONA			
17 α -hidroxi- pregnenolona	14.69 ± 5.60	20.25 ± 8.63	13.08 ± 8.44
No identificado	13.65 ± 3.50	9.68 ± 3.81	7.06 ± 4.88
% de P ₅ remanente	53.61 ± 2.59	53.61 ± 11.22	64.87 ± 11.77

Sistema de disolventes utilizado: éter etílico: hexano, 3:1 (v/v). Los valores representan la media \pm la desviación estándar de n=6. Tiempo de incubación: 60 minutos.

Tabla 6. RECRISTALIZACIÓN A PARTIR DEL METABOLISMO DE PREGNENOLONA

Metabolito	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (cpm/mg)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
HEMBRA						
17 α -hidroxi- pregnenolona	2,809.9	2,151.5	2,111.1	1,830.5	1,615.9	1,597.1
5 β -pregnandioli	1,321.6	594.7	252.2	159.9	112.8	76.2
Pregnenolona	3,884.9	3,848.3	3,984.2	3,582.2	3,535.6	3,498.2
Colesterol	1,162.2	494.2	172.8	66.2	51.9	22.7
MACHO						
17 α -hidroxi- pregnenolona	2,910.3	2,520.5	1,553.9	1,152.4	970.2	981.5
5 β -pregnandioli	2,599.5	947.2	469.9	307.7	225.6	87.0
Pregnenolona	1,577.3	1,516.7	1,500.3	1,367.6	1,336.0	1,351.2
Colesterol	1,519.6	522.5	199.1	85.0	48.4	19.6

C= cristalización. Se emplearon embriones de 13 días. Disolventes utilizados para 17 α OHP₅: metanol: acetona, 1:1; para 5 β -pregnandioli y P₅: metanol; para colesterol: etanol.

La identidad de la $17\alpha\text{OHP}_5$ se comprobó a través de las pruebas de cristalizaciones sucesivas (Tabla 6).

Llevando a cabo la incubación de células de la MCA con $[^3\text{H}]\text{A}_4$ durante 60 minutos, no fue posible detectar su biotransformación hacia algún metabolito.

En ningún caso, después de la incubación de células de la MCA con P_5 , se encontró como metabolito a la progesterona.

No se encontró la síntesis de E_2 ni de E_1 en ninguno de los experimentos realizados con los tres precursores radiactivos utilizados.

Tabla 7. METABOLISMO DE P₅ A LOS 15 MINUTOS EN CÉLULAS
DE LA MCA DE EMBRIONES DE AMBOS SEXOS (PROMEDIO)

SUSTRATO/ metabolito	PORCENTAJE DE TRANSFORMACIÓN
PREGNENOLONA	
Progesterona	0.96 ± 1.02
17 α -hidroxipregnenolona	6.34 ± 4.35
No identificado	6.00 ± 3.81
% de P ₅ remanente	61.42 ± 9.00

Sistema de disolventes utilizado: éter etílico: hexano, 3:1
(v/v). Los valores representan la media \pm la desviación estándar
de n=12.

Edad: 15 días de incubación.

DISCUSIÓN

Debido a que la viabilidad de las células de la MCA en todos los experimentos fue mayor al 90%, considero que el tratamiento con tripsina para disgregar las células es adecuado, permite la separación total de las mismas, manteniendo la capacidad de dichas células para metabolizar hormonas esteroides. Esto concuerda con lo observado previamente en suspensiones de células ováricas, que recibieron el mismo tratamiento (Rodríguez-Maldonado, 1995).

De acuerdo con nuestros resultados, la incubación de células de la MCA con [³H]DHEA dio como principal metabolito a A₄. Los metabolitos obtenidos fueron identificados por su R_f en cromatografía en capa fina, utilizando dos sistemas de disolventes distintos.

La identidad de estos metabolitos también se confirmó a través de las pruebas de recristalizaciones sucesivas, hasta actividad específica constante. En las recristalizaciones, lo esperado es que, para el caso de un metabolito producido, la radiactividad de los cristales se conserve de forma constante; sin embargo, para los cristales de A₄, se observó una pérdida aproximada del 9% de la radiactividad en cada recristalización, mientras que para el Δ⁵-diol, fue del 14%; estos valores difieren claramente de lo sucedido con un testigo negativo (en este caso colesterol), en el que la radiactividad decae alrededor del 90%

después de dos recristalizaciones. Nosotros pensamos que esa pérdida podría tener varias explicaciones; una de ellas es la forma en que fueron recuperadas las aguas madres, ya que pueden quedar remanentes de las mismas en los cristales, y su radiactividad ser cuantificada junto con la de éstos. Otra posible explicación podría ser que dos diferentes metabolitos estén cocrystalizando, de modo que el metabolito que cocrystaliza con el esteroide problema, se va eliminando poco a poco en cada recristalización. Esto último ha sido observado previamente en la cristalización de E₁ y E₂ y en la de diosgenina (Juárez-Oropeza, comunicación personal).

La presencia de A₄ en la incubación de células de la MCA con DHEA tritiada, está indicando que en este tejido hay actividad de la enzima 3β-HSD. Los resultados sugieren que la actividad de esta enzima aumentó significativamente en relación a la edad.

La transformación hacia A₄ fue mayor en las hembras que en los machos, a los 15 días de edad embrionaria. Como antecedente se puede citar que en la rata, la actividad enzimática de la 3β-HSD es alrededor de 3 veces mayor en las suprarrenales de animales hembra que en las del macho (Trudel y cols., 1991); algo similar fue reportado para el caso de la mujer (Tagatz y Gurpide, 1973). La A₄ circulante es utilizada como un precursor en la producción extraglandular de E₁ y T (Schubert y Schade, 1977; Imataka y cols., 1988a; Imataka y cols., 1989). En las aves, el sexo básico es el masculino, por lo tanto, el hecho de haber

encontrado una mayor cantidad de A_4 sintetizada en la MCA de las hembras, podría tener la ventaja de aportar una mayor cantidad de precursores aromatizables y compensar una mayor necesidad de estrógenos en estos embriones.

A pesar de haber encontrado la actividad enzimática de la 3β -HSD en la MCA mediante la transformación de DHEA a A_4 , esta misma actividad no se observó al realizar la incubación con P_5 , pues en ningún caso se detectó la síntesis de P_4 ; por tal razón, se realizaron experimentos a distintos tiempos de incubación, de 15 a 60 minutos, sin registrarse actividad de la 3β -HSD (Tabla 7). Una interpretación es que estamos en presencia de isoformas de la 3β -HSD, lo que explicaría una preferencia especial por un sustrato en particular, en este caso por DHEA.

La existencia de varias isoenzimas de la 3β -HSD se ha podido demostrar en numerosos tejidos periféricos de mamíferos, tanto primates como no primates (Lachance y cols., 1990; Simard y cols., 1993; Labrie y cols., 1994; Payne y cols., 1995). Los tejidos esteroideogénicos clásicos manifiestan un tipo de la enzima, mientras que los órganos periféricos expresan otro, y cada órgano puede presentar de forma particular, una o más de estas isoformas (Rhéaume y cols., 1991; Labrie y cols., 1995; Martel y cols., 1994). En el caso del pollo, se han descrito dos distintos mRNA para la 3β -HSD en la glándula suprarrenal (Nakabayashi y cols., 1995), y no se descarta la posibilidad de que se expresen de manera específica en los diferentes tejidos,

teniendo cada isoforma, distinta afinidad por un sustrato determinado.

La amplia distribución de las isoenzimas contribuye en la regulación de la actividad de la 3β -HSD, de acuerdo a las necesidades particulares de cada órgano. En el humano, se han descrito algunas alteraciones relacionadas con la deficiencia funcional de la isoenzima de la 3β -HSD que está presente en las gónadas (tipo II). Esta alteración está relacionada con una pobre síntesis de andrógenos, que suele producir pseudohermafroditismo masculino. También es común que se presente una carencia de estrógenos y la consiguiente acumulación de sustratos, entre ellos la 17α OHP, y la A_4 (Simard y cols., 1995). Existe otro tipo de deficiencia de esta enzima, que se manifiesta tardíamente y que provoca hirsutismo en mujeres premenopáusicas y en ocasiones, ovario poliquístico (Simard y cols., 1995; Cravioto y cols., 1986). Las diferentes isoenzimas de la 3β -HSD en el humano, no parecen tener alta especificidad por sustrato; lo que sí hay es un mayor grado de afinidad por sustrato de la isoenzima de localización periférica (tipo I), con respecto a la gonadal (Rhéaume y cols., 1991; Simard y cols., 1995).

El otro metabolito identificado a partir de la incubación de la MCA con [3 H]DHEA, es el Δ^5 -diol, lo que sugiere la presencia de la enzima 17β -HSD. La actividad de esta enzima se mantuvo constante y no se observaron diferencias en cuanto a su actividad

en hembras y machos. El Δ^5 -diol es un andrógeno no aromatizable; este metabolito es utilizado como precursor directo de T; previamente se había reportado al Δ^5 -diol como un producto del metabolismo de DHEA en las gónadas del embrión de pollo (Imataka y cols., 1989). La actividad de la 17β -HSD es indispensable para la síntesis de todos los andrógenos y estrógenos activos (Labrie y cols., 1995). Una deficiencia en esta actividad enzimática trae como consecuencia alteraciones producidas por la carencia de andrógenos y estrógenos, entre las que se encuentra el pseudohermafroditismo masculino.

La MCA metabolizó P₅, principalmente en 17α OHP₅, actividad dada por la enzima 17α -hidroxilasa; En estudios previos (Imataka y cols., 1989), se encontró que el ovario embrionario del pollo utiliza a la 17α OHP₅ como precursora de DHEA, sin embargo, en la MCA, este paso metabólico, dado por la C17,20-liasa, no se encontró bajo las condiciones de incubación empleadas; por lo tanto, en la MCA hay actividad de la 17α -hidroxilasa, pero no se detectó la presencia de la C17,20-liasa. Se ha sugerido que en las gónadas en desarrollo, hay diferencias sexuales en cuanto a la regulación de la 17α -hidroxilasa, la C17,20-liasa y la aromatasa, en los embriones de pollo (Imataka y cols., 1988b). De acuerdo a nuestros resultados, no parece probable que en la MCA se esté dando una regulación parecida a la de las gónadas, en lo que respecta a la actividad de la 17α -hidroxilasa, pues se

encontró que esta enzima se expresa de manera similar en los dos sexos.

La actividad de la enzima aromatasa está presente en varios tejidos, incluyendo la placenta y algunos órganos periféricos (Labhart, 1990; Labrie y cols., 1995), aunque la mayor actividad de esta enzima es gonadal (Tanabe y cols., 1986). En ninguno de nuestros experimentos se encontró la actividad de esta enzima, ya sea utilizando [³H]A₄ o [³H]DHEA como sustratos, por lo que posiblemente la MCA no participe en la aromatización de andrógenos.

Se ha encontrado que en el embrión de pollo funcionan tanto la vía Δ^4 como la Δ^5 para la síntesis de esteroides; sin embargo, en casos específicos existen preferencias con respecto a la utilización de cada una de las rutas metabólicas. En el ovario de ave, la vía predominante es la vía de los Δ^5 , mientras que en el testículo predomina la vía de los Δ^4 (Imataka y cols., 1989). Con base en nuestros resultados, no podemos afirmar que en la MCA haya preferencia por alguna de las vías metabólicas, puesto que no hay datos suficientes que apoyen esta idea; por la vía de los Δ^5 están presentes las enzimas 17 α -hidroxilasa del P450_{C17} y la 17 β -HSD, y el paso de la Δ^5 a la Δ^4 es mediado por la enzima 3 β -HSD.

En el caso de los mamíferos, el feto y la placenta conforman una unidad fetoplacentaria en la esteroidogénesis; ambas estructuras son complementarias, ya que ninguna de las dos cuenta

En el caso de los mamíferos, el feto y la placenta conforman una unidad fetoplacentaria en la esteroidogénesis; ambas estructuras son complementarias, ya que ninguna de las dos cuenta con todas las enzimas necesarias para cumplir con esta función. En las aves, la MCA desempeña algunas de las funciones metabólicas que lleva a cabo la placenta de los mamíferos. A la fecha, no se habían reportado pruebas de la actividad esteroidogénica de esta estructura, exceptuando el trabajo de McNatt y cols. en 1992, en el que detectaron el metabolismo de cortisol por la actividad de la enzima 20β -cetoesteroide reductasa. El hecho de haber encontrado en el presente trabajo, algunas de las enzimas que participan en la esteroidogénesis, hace pensar que, entre el embrión de pollo y la MCA, exista un tipo de cooperación que recuerda la de la unidad fetoplacentaria. No se sabe si los esteroides aquí formados, son utilizados como hormonas que influyen directamente en alguna de las funciones de esta membrana, o si sean producidos como intermediarios de la ruta metabólica; otra posibilidad es que lleven a cabo alguna función no esteroide en dicha membrana. Para caracterizar más detalladamente las actividades enzimáticas en este tejido se requerirán más estudios.

La presencia de la actividad enzimática de la 3β -HSD, la 17β -HSD, la 17α -hidroxilasa y la aromatasa, ha sido reportada previamente en una gran variedad de tejidos de mamíferos. Esto adquiere significado por el suplemento relativamente constante de

precursores que reciben los órganos periféricos, aportado por las glándulas suprarrenales. En el presente trabajo, se identificó la actividad de las tres primeras enzimas en las células de la MCA en cultivo; éstas son comúnmente observadas en una localización periférica, por lo que esta membrana parece comportarse como un órgano periférico en cuanto al metabolismo de hormonas, característica encontrada también en la placenta. La formación de hormonas esteroides en estos tejidos puede llegar a ser considerable, como consecuencia del gran tamaño que presentan algunos de ellos, como por ejemplo el hígado (Martel y cols., 1994).

Respecto al posible papel que puede estar jugando la MCA en la esteroidogénesis del embrión de pollo, se proponen varias posibilidades: a) Una de ellas es que, la DHEA que sirve como sustrato para la síntesis de A_4 y Δ^5 -diol en la MCA, sea proporcionada a este tejido por las glándulas suprarrenales y las gónadas (Figura 7); b) otra es que la MCA contribuya en la producción de hormonas que, a su vez, sirvan como precursoras para la síntesis de hormonas más activas en otros tejidos; c) que la MCA tenga una función "anticipatoria", produciendo hormonas que puedan servir para preparar al embrión para el nacimiento y la vida postnatal; d) por no encontrar vías esteroidogénicas completas (P450_{C17} sólo como 17 α -hidroxilasa y ausencia de actividad de aromatasa), podría considerarse a la MCA como un

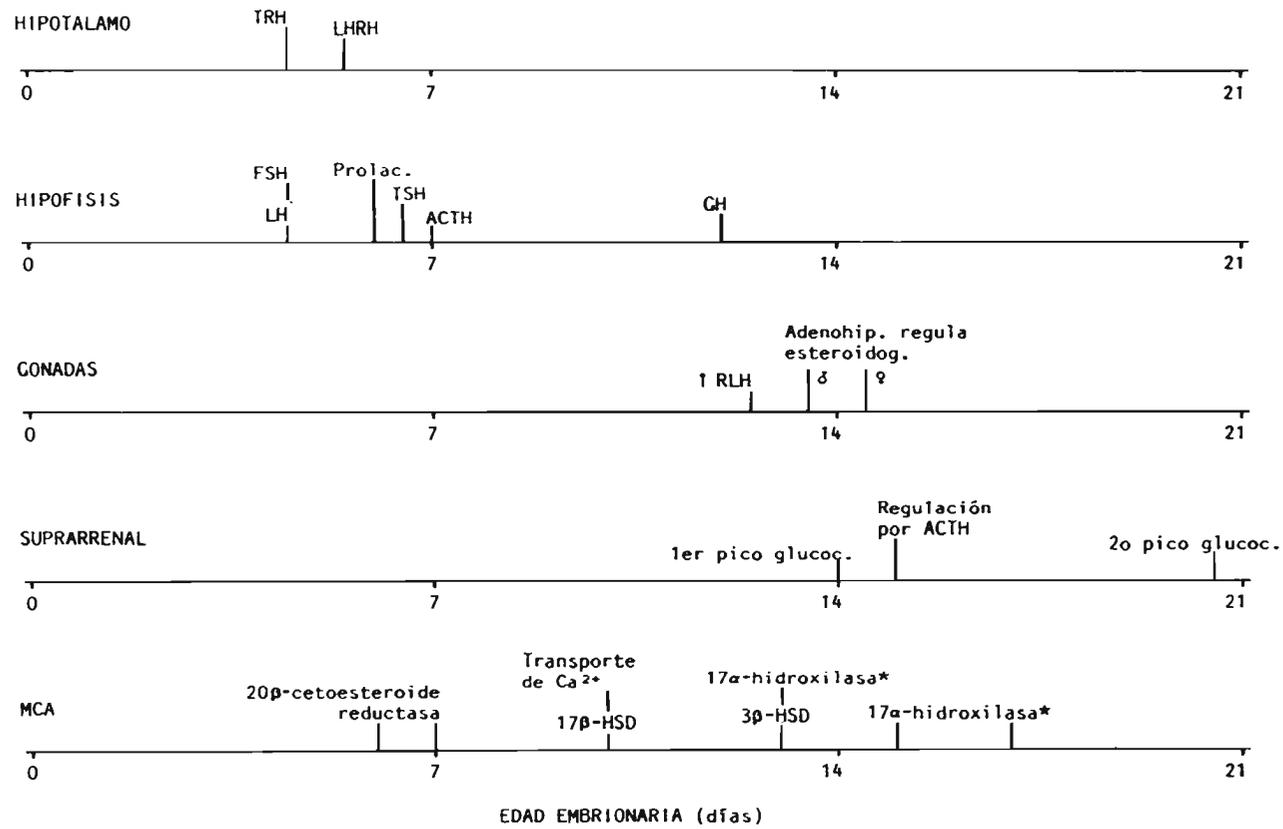


Figura 7. Relación temporal entre distintas funciones endócrinas durante el desarrollo del embrión de pollo. Abreviaturas: ACTH, hormona adrenocorticotrópica; adenohip., adenohipófisis; esteroidog., esteroidogénesis; FSH, hormona folículo estimulante; glucoc., glucocorticoides; GH, hormona del crecimiento; LH, hormona luteinizante; LHRH, hormona liberadora de gonadotropinas; RLH, receptores a LH; TRH, hormona liberadora de tirotrópina; TSH, tirotrópina. * únicos días estudiados. Basado en Scanes, 1987 y Woods, 1987.

tejido que sintetiza hormonas que pueden estar teniendo un efecto local, regulando funciones sobre sí misma.

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, también se detectó la actividad enzimática de la 3β -HSD y la 17β -HSD en la teca externa de folículos preovulatorios del ovario de gallina (Rodríguez-Maldonado, 1995), sin embargo, en la teca externa además estuvo activa la aromatasa, enzima que parece estar ausente en la MCA.

Podemos concluir, que la incubación de células de la MCA del embrión de pollo dio como resultado la identificación de la actividad de las enzimas 3β -HSD, 17β -HSD y 17α -hidroxilasa, que están relacionadas con la síntesis de esteroides. Por lo anterior, podemos afirmar que la MCA es un tejido que está involucrado en la formación de hormonas esteroides, por lo que esta estructura puede participar en la síntesis y el metabolismo de hormonas que son necesarias para el desarrollo embrionario.

REFERENCIAS

- Akins, R.E. and Tuan, R.S. (1993a). Transepithelial calcium transport in the chick chorioallantoic membrane I. Isolation and characterization of chorionic ectoderm cells. *J. Cell Sci.* **105**: 369-379.
- Akins, R.E. and Tuan, R.S. (1993b). Transepithelial calcium transport in the chick chorioallantoic membrane II. Compartmentalization of calcium during uptake. *J. Cell Sci.* **105**: 381-388.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. (1992). **Biología molecular de la célula**. Ed. Omega, Barcelona. pp 768-785.
- Antila, E., Leikola, A. and Tähkä, S. (1984). Early steroid metabolism by chick blastoderm *in vitro*. *Steroids.* **43** (3): 315-323.
- Ar, A., Girard, H. and Dejours, P. (1987). Oxygen consumption of the chick embryo's respiratory organ, the chorioallantoic membrane. *Respir. Physiol.* **68**: 377-388.
- Bain, P.A., Yoo, M., Clarke, T., Hammond, S.H. and Payne, A.H. (1991). Multiple forms of mouse 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase and differential expression in gonads, adrenal glands, liver, and kidneys of both sexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 8870-8874.
- Carlson, B.M. (1990). **Embriología básica de Patten**. 5a. ed. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. México. pp 259-299.
- Clark, N.B. and Simkiss, K. (1980). Time, targets and triggers: a study of calcium regulation in the bird. In: **Avian Endocrinology**. Edited by August Epple and Milton H. Stetson. Academic Press. U.S.A. pp 200-203.
- Clarke, T.R., Bain, P.A., Sha, L. and Payne, A.H. (1993). Enzyme characteristics of two distinct forms of mouse 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase complementary deoxyribonucleic acids expressed in COS-1 cells. *Endocrinology.* **132** (5): 1971-1976.
- Coleman, J.R. and Terepka A.R. (1972). Fine structural changes associated with the onset of calcium, sodium and water transport by the chick chorioallantoic membrane. *J. Membr. Biol.* **7**: 111-127.
- Cravioto, M.C., Ulloa-Aguirre, A., Bermúdez, J.A., Herrera, J., Lisker, R., Méndez, J.P. and Pérez-Palacios, G. (1986). A new

inherited variant of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase deficiency syndrome: evidence for the existence of two isoenzymes. *J. Clin Endocrinol. Metab.* **63** (2): 360-367.

Dunn, B.E. and Fitzharris, T.P. (1987). Endocytosis in the embryonic chick chorionic epithelium. *J. Exp. Zool. Suppl.* **1**: 75-79.

Dupont, E., Labrie, F., Luu-the, V. and Pelletier, G. (1991). Localization of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase throughout gestation in human placenta. *J. Histochem. Cytochem.* **39** (10): 1403-1407.

Elaroussi, M.A. and deLuca, H.F. (1994). Calcium uptake by chorioallantoic membrane: effects of vitamins D and K. *Am. J. Physiol.* **267** (6Pt1): E837-E841.

ElAttar, T. and Dirscherl, W. (1965). The metabolism of dehydroepiandrosterone in various organs of the rat. *Acta Endocrinol.* **50**: 123-130.

Genti-Raimondi, S., Olivier, N.S., Patrino, L.C. and Flury, A. (1989). Regulation of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in tissue fragments and microsomes from human term placenta: kinetic analysis and inhibition by steroids. *J. Steroid Biochem.* **32** (3): 413-420.

Gibb, W., Lavoie, J-C. and Roux, J.F. (1978). 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in human fetal membranes. *Steroids.* **32** (3): 365-372.

Gore-Langton, R.E. and Armstrong, D.T. (1988). Follicular steroidogenesis and its control. En: **The physiology of reproduction**. Vol 1. (Knobil, E. and Neill, J.D. ed.) Raven Press, Ltd. N.Y. pp 331-384.

Greco, T.L. and Payne, A.H. (1994). Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17 α -hydroxylase/C₁₇₋₂₀ lyase, and P450 aromatase in fetal mouse glands. *Endocrinology.* **135** (1): 262-268.

Hall, P.F. (1994). Testicular steroid synthesis: organization and regulation. En: **The physiology of reproduction** (Knobil, E. and Neill, J.D. ed.) Raven Press, Ltd. N.Y. pp 1335-1362.

Hamburger, V. and Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* **88**: 49-92.

Hicks, G.J.J. y Díaz-Zagoya, J.C. (1988). **Bioquímica e inmunología**. Vol. II. Ed. Piensa, U.N.A.M. México. pp 53-125.

Imataka, H., Suzuki, K., Inano, H., Kohmoto, K. and Tamaoki, B-I. (1988a). Developmental changes of steroidogenic enzyme activities in the embryonic gonads of the chicken: the sexual difference. *Gen. Comp. Endocrinol.* **71**: 413-418.

Imataka, H., Suzuki, K., Inano, H., Kohmoto, K. and Tamaoki, B-I. (1988b). Sexual differences of steroidogenic enzymes in embryonic gonads of the chicken. (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **69**: 153-162.

Imataka, H., Suzuki, K., Inano, H., Kohmoto, K. and Tamaoki, B-I. (1989). Biosynthetic pathways of testosterone and estradiol-17 β in slices of the embryonic ovary and testis of the chicken (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **71**: 69-79.

Inano, H., Ishii-Ohba, H., Sugimoto, Y., Ohta, Y., Morikawa, T., Yoshida, M. and Tamaoki, B. (1990). Purification and properties of enzymes related to steroid hormone synthesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **595**: 17-25.

Jaffe, R.B. (1991). Fisiología endócrina del feto y de la unidad fetoplacentaria. En: **Endocrinología de la reproducción**. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico. (Yen, S.S.C. y Jaffe, R.B. ed.) 3a. ed. Ed. Médica Panamericana. Argentina. pp 915-946.

Komazaki, S., Takada, M. and Clark, N.B. (1992). Ultrastructural localization of calcium in the chick chorioallantoic membrane as revealed by cytochemistry and X-ray microanalysis. *Anat. Embriol.* **186**: 529-535.

Labrie, F., Simard, J., Luu-The, V., Pelletier, G., Belghmi, K. and Bélanger, A. (1994). Structure, regulation and role of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase and aromatase enzymes in the formation of sex steroids in classical and peripheral intracrine tissues. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* **8** (2): 451-474.

Labrie, F., Bélanger, A., Simard, J., Luu-The, V. and Labrie, C. (1995). "Intracrinologie" Autonomie et liberté des tissus périphériques. *Annales d'Endocrinologie (Paris)*. **56**: 23-29.

Lachance, Y., Luu-The, V., Labrie, C., Simard, J., Dumont, M., de Launoit, Y., Guérin, S., Leblanc, G. and Labrie, F. (1990). Characterization of human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -

isomerase gene and its expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **265** (33): 20469-20475.

Le Goascogne, C., Sananes, N., Eychenne, B., Gouézou, M., Baulieu, E-M. and Robel, P. (1995). Androgen biosynthesis in the stomach: expression of cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase messenger ribonucleic acid and protein, and metabolism of pregnenolone and progesterone by parietal cells of the rat gastric mucosa. *Endocrinology*. **136** (4): 1744-1752.

Leeson, T.S. and Leeson, C.R. (1963). The chorio-allantois of the chick. Light and electron microscopic observations at various times of incubation. *J. Anat. Lond.* **97** (4): 585-595.

Lillie, F.R. (1927). **The development of the chick. An introduction to Embryology.** 2nd edition. Henry Holt and Company. New York.

Maragoudakis, M.E., Panoutsacopoulou, M. and Sarmonika, M. (1988). Rate of basement membrane biosynthesis as an index to angiogenesis. *Tissue & Cell*. **20** (4): 531-539.

Martel, C., Melner, M., Gagné, D., Simard, J. and Labrie, F. (1994). Widespread tissue distribution of steroid sulfatase, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase (3 β -HSD), 17 β -HSD 5 α -reductase and aromatase activities in the rhesus monkey. *Mol. Cell. Endocrinol.* **104**: 103-111.

McNatt, L.G., Lane, D. and Clark, A.F. (1992). Angiostatic activity and metabolism of cortisol in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chick embryo. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* **42** (7): 687-693.

Mendoza-Hernández, G., López-Solache, I., Rendón, J.L., Díaz-Sánchez, V. and Díaz-Zagoya, J.C. (1988). 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in canine pancreas. *J. Biochem. Biophys. Res. Comm.* **152** (1): 376-382.

Mendoza-Hernández, G., López-Solache, I. and Rendón, J.L. (1991). Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase activity in canine pancreas. *Life Science*. **47**: 467-475.

Metcalfe, J. and Stock, M.K. (1993). Current topic: Oxygen exchange in the chorioallantoic membrane, avian homologue of the mammalian placenta. *Placenta*. **14**: 605-613.

Nakabayashi, O., Nomura, O., Katsuhiko, N. and Mizuno, S. (1995). The cDNA cloning and transient expression of a chicken gene

encoding a 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^{5\rightarrow 4}$ isomerase unique to major steroidogenic tissues. *Gene*. **162**: 261-265.

Narbaitz, R. (1977). Structure of the intra-chorionic blood sinus in the chick embryo. *J. Anat.* **124** (2): 347-354.

Narbaitz, R. (1987). Role of vitamin D in the development of the chick embryo. *J. Exp. Zool. Suppl.* **1**: 15-23.

Narbaitz, R. and Tellier, P. (1974). The differentiation of the chick chorionic epithelium: an experimental study. *J. Embryol. Exp. Morph.* **32** (2): 365-374.

Ogunranti, J.O. (1992) Δ^5 - 3β -Hydroxysteroid dehydrogenase activity in rat oviduct and applications of oviductal steroidogenesis. *J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **44** (2): 145-50.

O'Malley, B.W. and Strott, C.A. (1991). Steroid hormones: Metabolism and mechanisms of action. En: **Reproductive Endocrinology**. (Yen, S.C.C. and Jaffe, R.B. ed.) 3th. ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia, U.S.A. pp 156-180.

Owczarzak, A. (1971). Calcium-absorbing cell of the chick chorioallantoic membrane. *Exp. Cell Res.* **68**: 113-129.

Payne, A.H. and Sha, L. (1991). Multiple mechanisms for regulation of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase, 17α -hydroxylase/ C_{17-20} lyase cytochrome P450, and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 messenger ribonucleic acid levels in primary cultures of mouse Leydig cells. *Endocrinology*. **129** (3): 1429-1435.

Payne, A.H., Clarke, T.R. and Bain, P.A. (1995). The murine 3β -hydroxysteroid dehydrogenase multigene family: structure, function and tissue-specific expression. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **53** (1-6): 111-118.

Rhéaume, E., Lachance, Y., Zhao, H-F., Breton, N., Dumont, M., de Lanouit, Y., Teudel, C., Luu-The, V., Simard, J. and Labrie, F. (1991). Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase in human adrenals and gonads. *J. Mol. Endocrinol.* **5** (8): 1147-1157.

Rodríguez-Maldonado, E. (1995). Metabolismo de hormonas esteroides en las células de la teca externa de fol culos preovulatorios del ovario de gallina. Tesis de Maestr a. Facultad de Medicina, UNAM.

Rogerson, F.M., LeHoux, J-G. and Mason, J.I. (1995). Expression and characterization of isoforms of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase in the hamster. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **55** (5/6): 481-487.

Scanes, C.G., Hart, L.E., Decuypere, E. and Kuhn, E.R. (1987). Endocrinology of the avian embryo: An overview. *J. Exp. Zool. Suppl.* **1**: 253-264.

Schindler, A.E. (1990). Embarazo. En: **Endocrinología clínica. Teoría y práctica.** (Labhart, A. ed) Ed. Salvat. Barcelona. pp 617-654.

Schubert, K. and Schade, K. (1977). Placental steroid hormones. *J. Steroid. Biochem.* **8** (5): 359-365.

Simard, J., Couet, J., Durocher, F., Labrie, Y., Sanchez, R., Breton, N., Turgeot, C. and Labrie, F. (1993). Structure and tissue-specific expression of a novel member of the rat 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase (3 β -HSD) family. *J. Biol. Chem.* **268** (26): 19659-19668.

Simard, J., Sanchez, R., Durocher, F., Rhéaume, C.T., Turgeon, C., Labrie, Y., Luu-The, V., Mebarki, F., Morel, Y., de Launoit, Y. and Labrie, F. (1995). Structure-function relationships and molecular genetics of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene family. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* **55** (5/6): 489-505.

Skalinsky, E.I. and Kondalenko, V.F. (1963). Electron microscopic studies of the chick chorioallantois during embryogenesis. *Acta Morphol. Hung.* **12**: 247-259.

Solomon, S. (1994). The primate placenta as an endocrine organ. Steroids. En: **The physiology of reproduction.** (Knobil E. and Neill, J.D. ed). 2nd. ed. Raven Press, Ltd. N.Y. pp 863-873.

Tagatz, G. and Gurpide, G.E. (1973). Hormone secretion by the normal human ovary. In: **Handbook of Physiology.** Endocrinology, Vol II. Female reproductive system, Part I. (Greep, R.O. and Astwood, E.B. ed). American Physiological Society, Washington. Section 7.

Tanabe, Y., Saito, N. and Nakamura, T. (1986). Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **63**: 456-463.

Tonetta, S.A., De Vinna, R.S., and DiZerega, G.S. (1987). Thecal cell 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase activity: modulation by

human chorionic gonadotropin, progesterone, estradiol-17 beta and dihydrotestosterone. *J. Steroid. Biochem.* **28** (1): 77-82.

Trudel, C., Couet, J., Martel, C., Labrie, C. and Labrie, F. (1991). Regulation of adrenal 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase expression and activity by adrenocorticotropin and corticosterone in the rat. *Endocrinology.* **129**: 2099-2084.

Tuan, R.S. (1980). Calcium transport and related functions in the chorioallantoic membrane of cultured shell-less chick embryos. *Dev. Biol.* **74**: 196-204.

Tuan, R.S. (1987). Mechanism and regulation of calcium transport by the chick embryonic chorioallantoic membrane. *J. Exp. Zool. Suppl.* **1**: 1-13.

Vallet-Strouve, C., Fresinsky, E. and Mowszowicz, I. (1983). Further characterization of 17β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in cultured myometrial cells: cofactor dependency and subcellular localization. *Steroids.* **42** (5): 525-537.

Woods, J.E. (1987). Maturation of the hypothalamo-adenohypophyseal-gonad (HAG) axes in the chick embryo. *J. Exp. Zool. Suppl.* **1**: 267-271.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

ANEXOS

SOLUCIONES

Solución salina balanceada libre de Ca^{2+} y Mg^{2+}

NaCl	8.0 gr
KH_2PO_4	0.2 gr
KCl	0.2 gr
Na_2HPO_4	1.15 gr

Disolver aforando a 1,000 ml de agua desionizada y ajustando el pH a 7.4 con bicarbonato de sodio.

Líquido de centelleo

PPO	4.0 gr
Dimetil-POPOP	0.2 gr
Tolueno	667 ml
Tritón X-100	333 ml

Medio Mínimo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) + albúmina

Dulbecco	1.34 gr
Albúmina sérica bovina	0.1 gr

Disolver aforando a 100 ml de agua desionizada ajustando el pH a 7.4 con bicarbonato de sodio al 5%.

Tripsina al 0.25%

Tripsina	0.05 gr
----------	---------

Disolver en 20 ml de solución salina balanceada libre de Ca^{2+} y Mg^{2+}

Inhibidor de tripsina al 0.5%

Inhibidor de tripsina	0.1 gr
-----------------------	--------

Disolver en 30 ml de DMEM + albúmina.

Solución de azul tripano

Azul tripano	400 mg
NaCl	810 mg
KH_2PO_4	60 mg
Metil p-hidroxibenzoato	50 ml
Agua destilada	90 ml

Calentar a punto de ebullición y enfriar a temperatura ambiente; ajustar el pH a 7.4 con NaOH 1N y aforar a 100 ml.

ESTEROIDES UTILIZADOS

Nombre común	Nombre sistemático
Pregnenolona (P ₅)	5-pregnen-3 β -hidroxi-20-ona
17 α -hidroxipregnenolona (17 α OHP ₅)	5-pregnen-3 β ,17 α -dihidroxi-20-ona
Dehidroepiandrosterona (DHEA)	5-androsten-3 β -hidroxi-17-ona
Androstendiol (Δ^5 -diol)	5-androsten-3 β ,17 β -diol
Progesterona (P ₄)	4-pregnen-3,20-diona
17 α -hidroxiprogesterona (17 α OHP ₄)	4-pregnen-17 α -hidroxi-3,20-diona
Androstendiona (A ₄)	4-androsten-3,17-diona
Testosterona (T)	4-androsten-17 β -hidroxi-3-ona
Estrona (E ₁)	1,3,5(10)-estratrien-3-ol-17-ona
Estradiol (E ₂)	1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol