



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PAPEL DE LA GONADOTROPINA DEL SUERO DE YEGUA PREÑADA (PMS) EN EL DESARROLLO FOLICULAR DEL OVARIO NEONATAL DEL RATON.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MARIA DOLORES LARA MADRIGAL



DIRECTOR DE TESIS: M. EN IBB. NORMA A. MORENO MENDOZA.



1998

FACULTAD DE CIENCIAS
SECRETARÍA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

260826



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrin Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Papel de la Gonadotropina del

Suero de Yegua Preñada (PMS) en el Desarrollo Folicular del Ovario Neonatal del Ratón.

realizado por María Dolores Lara Madrigal

con número de cuenta 8725988-9 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario M. en IRB. Norma Angélica Moreno Mendoza

Propietario Dra. Concepción Sánchez Gómez

Propietario Dr. Guillermo Laguna Hernández

Suplente M. en C. Leda Carolina Torres Maldonado

Suplente M. en C. Luis Ignacio Terrazas Valdés

FACULTAD DE CIENCIAS



Consejo Departamental de Biología DEPARTAMENTO
M. en C. Alejandro Martínez Mend DE BIOLOGIA

*EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR DEL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO, BAJO LA DIRECCIÓN DE:
La M. en IBB. Norma Angélica Moreno Mendoza.*

DEDICATORIA

A mis Padres Abigail Madrigal y Miguel Lara por darme el apoyo y la fortaleza para llegar a esta etapa tan importante de mi carrera.

A mis Hermanos Miguel, Manuel y Martha por su cariño y comprensión.

Y dedico muy especialmente esta tesis a mi Hermano menor Armando como un ejemplo de que no importan las dificultades a las que uno llegue a enfrentarse en la vida; con decisión, entrega y coraje se logra lo que uno desea.

No puedo dejar de mencionar a mi Primo Juan Lara que tanto ayudó a mi familia y a mí en los momentos más difíciles.

Con mucho cariño a mis Amigos Raquel Mondragón, Patricia Hong, Remigio Cabral, Sofía, Pepe y Alejandra.

*Con gran Cariño y profundo agradecimiento a Ti Ricardo S.
por compartir conmigo esta etapa tan difícil de mi carrera y por
darme tu comprensión, apoyo y amor en los momentos que más
te necesitaba.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Merchant Larios por abrirme las puertas de su laboratorio y dejarme conocer las maravillas de la investigación.

A la M. en IBB. Norma Angélica Moreno Mendoza por su excelente asesoramiento y apoyo para la realización de esta tesis.

Al jurado por sus valiosas observaciones y sugerencias.

*Dra. Concepción Sánchez Gómez
Dr. Guillermo Laguna Hernández
M.en C. Leda Carolina Torres Maldonado
M. en C. Luis Ignacio Terrazas Valdés*

Con profundo agradecimiento al Dr. Joaquín Herrera por la realización de la técnica de Radioinmunoanálisis.

A Arturo Salame por su valioso asesoramiento para la comprensión de este trabajo.

Y hago partícipe de los agradecimientos al M.en C. Alejandro Marmolejo por su excelente asesoramiento técnico y por ser un gran compañero. Asimismo, agradezco al Sr. José Guadalupe Baltazar por su invaluable apoyo técnico brindado.

A mis compañeros de laboratorio: Ismael, Karla, Jaqueline, Jorgelina, Esther, Sra. Martha y ala Sra. Marielena.

Y a quienes de alguna manera han contribuido para la realización de éste trabajo.

GRACIAS DE VERDAD

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| I. RESUMEN | 1 |
| II. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 2.1 ANTECEDENTES..... | 3 |
| 2.1.1 Determinación del sexo en mamíferos..... | 3 |
| 2.1.2 Morfogénesis gonadal..... | 3 |
| A) <i>Origen y migración de las células germinales primordiales(CGP)</i> | 4 |
| B) <i>Establecimiento de la gónada indiferenciada</i> | 8 |
| C) <i>Diferenciación sexual de la gónada</i> | 9 |
| 2.1.3 Diferenciación del testículo..... | 10 |
| 2.1.4 Diferenciación del ovario..... | 11 |
| 2.2 FOLICULOGÉNESIS..... | 12 |
| 2.2.1 Detención de la meiosis..... | 15 |
| 2.2.2 Células esteroidogénicas y su origen..... | 15 |
| 2.2.3 Desarrollo de la glándula intersticial..... | 16 |
| 2.3 ESTEROIDOGÉNESIS..... | 18 |
| 2.3.1 Control de la esteroidogénesis..... | 20 |
| 2.3.2 Control de la esteroidogénesis <i>in vitro</i> | 21 |
| 2.3.3 Gonadotropina del suero de yegua preñada (PMSG)..... | 21 |
| III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 23 |
| IV. OBJETIVOS | 24 |
| • General | |
| • Particulares | |
| V. MATERIAL Y MÉTODO | 25 |
| 5.1 Animales..... | 25 |
| 5.2 Obtención de las gónadas..... | 25 |
| 5.3 Cultivo de órganos..... | 25 |
| 5.4 Actividad histoenzimática de la $\Delta 5-3\beta$ - HSD..... | 27 |
| 5.5 Detección inmunohistoquímica de Laminina..... | 28 |

| | | |
|--------------|---|----|
| 5.6 | Microscopía de luz (procesamiento en epón-812)..... | 28 |
| 5.7 | Determinación cuantitativa de los esteroides | |
| | intermediarios de las vías $\Delta 5$ y $\Delta 4$ | 29 |
| | A) <i>Preparación de la muestra</i> | 29 |
| | B) <i>Extracción</i> | 30 |
| | C) <i>Separación de los esteroides</i> | 30 |
| | D) <i>Radioinmunoanálisis</i> | 31 |
| VI. | RESULTADOS | 32 |
| 6.1 | Descripción estructural de ovarios obtenidos <i>in situ</i> | 32 |
| | A) <i>Ovarios de 1 día postparto (dpp)</i> | 32 |
| | B) <i>Ovarios de 3 dpp</i> | 32 |
| | C) <i>Ovarios de 10 dpp</i> | 33 |
| 6.2 | Actividad Histoenzimática de la $\Delta 5$ -3 β -HSD de ovarios | |
| | tratados <i>in vitro</i> con y sin PMSG..... | 33 |
| | A) <i>Ovarios de 1 dpp</i> | 33 |
| | B) <i>Ovarios de 3 dpp</i> | 34 |
| 6.3 | Detección inmunohistoquímica de Laminina en ovarios | |
| | tratados <i>in vitro</i> con y sin PMSG..... | 34 |
| | A) <i>Ovarios de 1 dpp</i> | 34 |
| | B) <i>Ovarios de 3 dpp</i> | 35 |
| 6.4 | Determinación cuantitativa de los esteroides | |
| | intermediarios de las vías $\Delta 5$ y $\Delta 4$ | 42 |
| 6.4.1 | RIAS de ovarios <i>in situ</i> | 42 |
| 6.4.2 | RIAS de ovarios <i>in vitro</i> | 42 |
| | A) <i>Ovarios cultivados sin PMSG</i> | 42 |
| | B) <i>Ovarios cultivados con PMSG</i> | 43 |
| VII. | DISCUSIÓN | 48 |
| VIII. | CONCLUSIONES | 53 |
| IX. | LITERATURA CITADA | 54 |

I. RESUMEN

Durante la etapa reproductiva, los ovarios contienen folículos en diferentes etapas de diferenciación. Aunque se sabe que a partir de un tamaño crítico, la maduración endócrina de los folículos depende de factores como las gonadotropinas, los mecanismos intra y extragonadales que controlan la formación de los folículos primordiales, su selección para iniciar su crecimiento y la diferenciación de las primeras células esteroidogénicas durante la ontogenia, están todavía por dilucidarse.

En el ovario de ratón la formación de folículos primordiales se inicia en la etapa prenatal y termina entre los días 3 y 4 postnatal. Asimismo, el primer tejido esteroidogénico se detecta a partir de la primera semana.

En este estudio reportamos como se lleva a cabo el proceso de foliculogénesis tanto *in situ* como *in vitro*. Realizando inmunohistoquímica contra laminina se observaron las tres etapas de individualización folicular. Asimismo, en ovarios mantenidos en cultivo organotípico, determinamos el efecto de la gonadotropina PMSG sobre el proceso de foliculogénesis, el establecimiento del primer tejido esteroidogénico del ovario y su actividad para producir esteroides.

Encontramos que los folículos primordiales se forman por un proceso de compartimentalización de los cordones sexuales del ovario embrionario y que dicho proceso sigue un gradiente médulo-cortical. Es decir, los primeros folículos que se individualizan son medulares y los últimos corticales. Los ovocitos crecen con el mismo gradiente, sin embargo, no es raro encontrar ovocitos medulares que alcancen su tamaño definitivo en la médula dentro de folículos que permanecen unidos por puentes formados por células foliculares.

El proceso de foliculogénesis *in vitro* es similar al que ocurre *in situ*, pero es más lento, y la presencia de gonadotropinas no parece ser necesaria para que ocurra normalmente.

Con la comparación realizada del desarrollo de los ovarios *in situ* con los ovarios mantenidos en cultivo, observamos una similitud importante que nos permite deducir que la foliculogénesis así como la diferenciación inicial del tejido intersticial esteroideogénico son procesos que dependen de un control intraovárico.

Finalmente concluimos, que las gonadotropinas hipofisarias no participan en el mecanismo de foliculogénesis en etapas tempranas del desarrollo del ovario, el papel que parecen desempeñar es la modulación del tejido esteroideogénico del estroma. Por otro lado, los ovarios del ratón recién nacido tienen la capacidad de secretar todos los esteroides intermediarios de las vías $\Delta 5$ y $\Delta 4$, y conforme avanza el proceso de foliculogénesis, los ovarios parecen comportarse como unidades funcionales.

II. INTRODUCCIÓN

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 Determinación del sexo en mamíferos

En los mamíferos el sexo de un embrión es determinado en el momento de la fecundación por el mecanismo XX-XY. Pero al principio del desarrollo el embrión tiene potencial de diferenciación en macho o en hembra, pues los primordios de los sistemas masculino y femenino están presentes.

Las hembras producen gametos que poseen un sólo tipo de cromosoma sexual X, contrariamente a los machos que poseen gametas con cromosomas sexuales tanto X como Y. Es por lo anterior que se dice que el macho es quien determina el sexo genético de la descendencia, y donde el cromosoma Y porta el gen que inicia el desarrollo del sexo gonadal hacia testículo.

El sexo gonadal se establece por un conjunto de procesos de diferenciación fisiológicos y morfológicos que lleva a cabo la gónada indiferenciada para transformarse en un testículo o en un ovario.

2.1.2 Morfogénesis gonadal

Durante la morfogénesis de la gónada, se lleva a cabo la interacción de dos tipos celulares importantes, las células germinales primordiales (CGP), futuras células sexuales que por su temprana diferenciación y localización se consideran de origen extraembrionario, y las células somáticas de origen mesodérmico, que son el resto de las células que conforman la gónada.

De esta manera las gónadas presentan un modelo de morfogénesis diferente al resto de los órganos, ya que en este caso existe la presencia de un componente celular extraembrionario

(CGP) y que juega un papel determinante en las dos principales etapas por las cuales pasan las gónadas durante su desarrollo: la etapa indiferenciada y la etapa de diferenciación gonadal.

Por lo tanto, tenemos que durante los procesos de morfogénesis de la gónada se pueden observar tres etapas: la primera corresponde a la colonización del primordio gonadal por las células germinales primordiales (CGP). La segunda corresponde a la organización del primordio gonadal como gónada indiferenciada. Y la tercera corresponde a la diferenciación de la gónada en un ovario o en un testículo. [Fig.1]

A) *Origen y migración de las Células Germinales Primordiales (CGP).*

El establecimiento de las distintas líneas celulares durante el desarrollo se lleva a cabo a diferentes tiempos. En el caso de la línea germinal su determinación parece ser uno de los más tempranos. Aunque el sexo de las gametas y con esto el sexo del individuo se establece en el momento de la fertilización, existe un período inicial en el cual no es posible detectar diferencias morfofuncionales entre las células precursoras de los ovocitos y los espermatozoides. Este período es el que corresponde al de las células germinales primordiales (CGP).

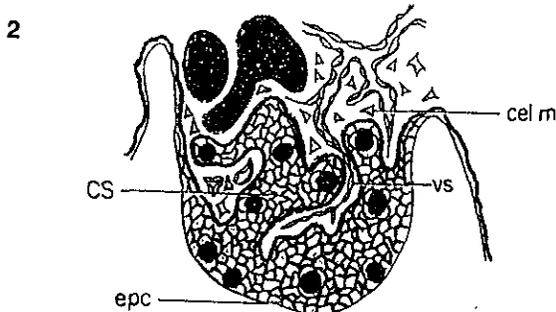
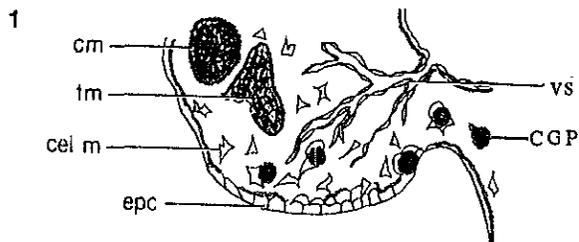
* *Origen de las CGP.*

En los mamíferos y en particular en el ratón, se sabe que las CGP derivan del ectodermo. Una serie de experimentos clásicos llevados a cabo en anfibios y aves demostraron que las CGP tienen un origen extraembrionario. (Brambell y Parkes, 1927; Everett, 1945; Merchant-Larios, 1975).

La etapa más temprana en la que se ha podido detectar a las CGP es en la de formación del pliegue cefálico entre los 7.5 y 8 días postcoito (*dpc*) (Chiquione 1954). Estas se localizan en el extremo caudal de la línea primitiva y en la base del alantoides, de donde migran hacia la región de las crestas genitales.

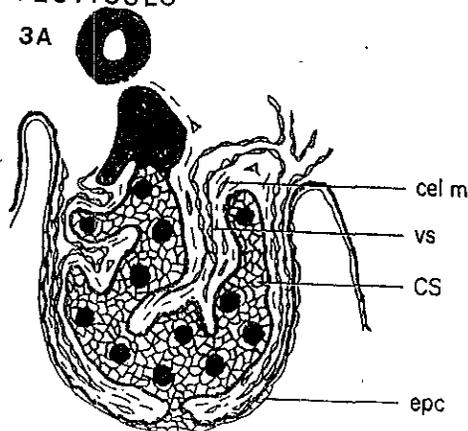
* *Migración de las CGP.*

En el ratón a los 9.5 *dpc* se forma el intestino por invaginación



TESTÍCULO

3A



OVARIO

3B

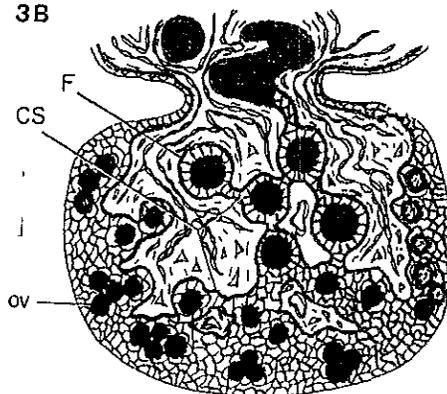


Fig.1 Esquema que muestra las tres etapas de morfogénesis de la gónada. 1) Corresponde a la colonización del primordio gonadal por las células germinales primordiales (CGP), donde también se muestra la invasión de los vasos sanguíneos (vs), el conducto mesonéfrico (cm), un túbulo mesonéfrico (tm), células mesenquimáticas (cel m) y el epitelio celómico o mesotelio (ep c). 2) Etapa en la cual ocurre la organización del primordio gonadal como gónada indiferenciada. En dicha etapa podemos observar los cordones sexuales (cs), que se continúan con el epitelio celómico (ep c). En el compartimento estromático encontramos vasos sanguíneos (vs) y las células mesenquimáticas (cel m). 3) Esta última etapa corresponde a la diferenciación de la gónada en un testículo o en un ovario. 3A) En el testículo se observa una invasión activa de mesénquima (cel m) y vasos sanguíneos (vs) los cuales separan a los cordones sexuales (cs) del epitelio celómico (ep c). 3B) La diferenciación del ovario se inicia cuando las CGP entran en meiosis, y se transforman en ovocitos (ov) al ser individualizados por las células epiteliales para formar folículos (F).

[Merchant-Larios, 1991]

del endodermo, debido a movimientos morfogénéticos. A los 10 *dpc* en la región ventral del mesonefros, se forma la cresta gonadal por un engrosamiento del epitelio celómico. Este evento coincide con la salida de las CGP del intestino y la migración de éstas por el mesenterio dorsal hacia la región de las crestas gonadales. Las CGP migran desde su sitio de origen hasta la región urogenital del embrión donde se formarán las gónadas. Las CGP se desplazan por dos tipos de movimientos: Pasivo y Activo.

En el pasivo, las CGP se mueven con los tejidos que las rodean, desplazándose de un lugar a otro por crecimiento diferencial del embrión. El endodermo del saco vitelino crece y se desplaza hacia el interior del embrión para formar parte del intestino primitivo posterior.

El movimiento activo implica la capacidad motriz de las CGP para desplazarse a través de los tejidos embrionarios. Mediante la emisión de pseudópodos estas células son capaces de romper la lámina basal del intestino, y después continuar su camino hacia las futuras crestas genitales a través de las células mesenquimáticas. Por otro lado también se postula que las CGP son capaces de secretar enzimas que hidrolizan los diferentes componentes que forman la matriz extracelular (colágena, mucopolisacáridos y glicoproteínas). Asimismo se han propuesto tres mecanismos para explicar la direccionalidad del desplazamiento de las CGP: [Fig.2].

— El primero es por un "*Gradiente de Concentración*", donde las CGP se guiarían por un proceso de quimiotaxis (Witschi,1948). No obstante, hasta ahora no se ha logrado caracterizar químicamente al supuesto factor quimiotáctico.

— El segundo mecanismo es el de "*Guía por contacto*", que implica la existencia de receptores específicos en la superficie de las CGP (Weiss, 1945).

— El tercer mecanismo es el más sencillo y se refiere a la "*Organización topográfica*" de las células somáticas del embrión en el momento del desplazamiento de las CGP, las cuales estarían dispuestas en tal forma que no podrían salirse de la trayectoria que mecánicamente las dirigiría hacia la cresta genital.

Además Alvarez-Buylla y Merchant-Larios (1986), observaron que la fibronectina, glucoproteína abundante en la matriz extracelular, es utilizada por las CGP para su migración.

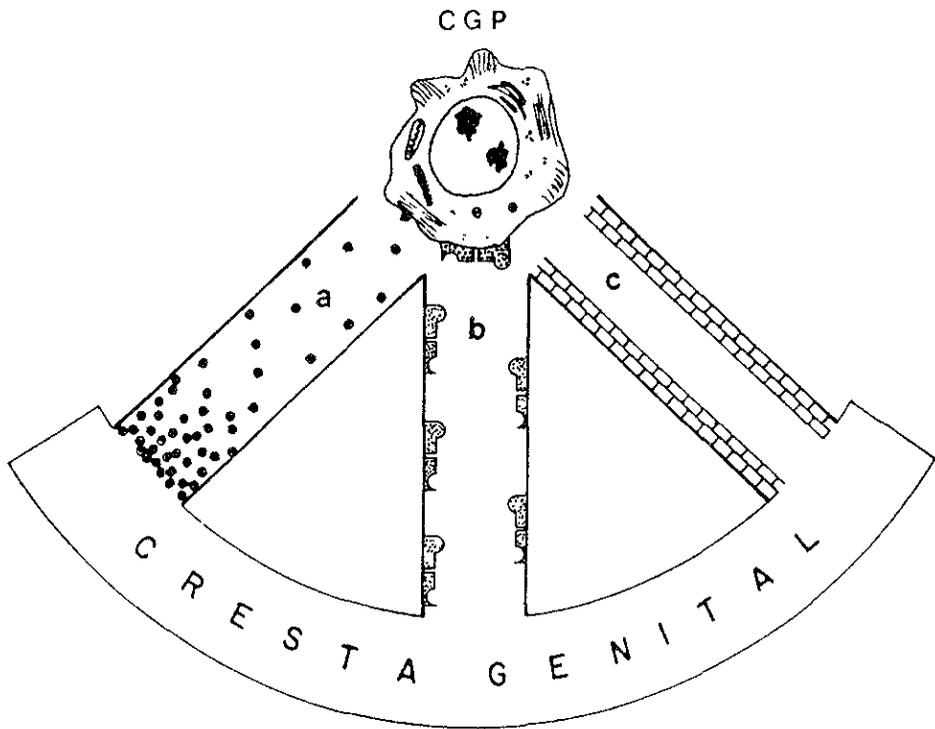


Fig.2. Mecanismos propuestos para explicar la direccionalidad del desplazamiento de las CGP. a) gradiente de concentración, b) guía por contacto y c) organización topográfica de las células somáticas.

B) *Establecimiento de la gónada indiferenciada*

Tras la llegada de las CGP a las crestas urogenitales, el epitelio sufre un engrosamiento y rápidamente proliferan las células somáticas en su superficie interna, el resto del mesénquima laxo sirve como sostén para los vasos sanguíneos que irrigan a la gónada. En esta etapa del desarrollo no existen diferencias morfológicas en las gónadas de ambos sexos. A esta etapa se le denomina gónada indiferenciada, que en el caso del ratón se establece a los 11.5 *dpc*.

La gónada indiferenciada es una estructura par, que se localiza en la región ventral del mesonefros y está constituida por tejido epitelial, mesenquimático y CGP. En esta etapa del desarrollo gonadal se diferenciarán dos importantes tejidos gonadales: los cordones sexuales y el estroma. Los primeros son estructuras epiteliales envueltos por una lámina basal, cuyas células están íntimamente asociadas a través de diversos tipos de uniones intercelulares. Es precisamente en estos cordones sexuales en donde se encuentran la mayoría de las CGP. Por otro lado, en el estroma están presentes células de tipo mesenquimático y varios vasos sanguíneos que irrigan a la gónada indiferenciada.

El origen de los componentes somáticos de la gónada ha sido motivo de gran controversia. Brambell en 1927, estudiando el desarrollo de la gónada del ratón, propuso que dichas células somáticas se originan por proliferación del epitelio celómico; Gillman (1948) y Burns (1961) propusieron que el testículo se diferencia por proliferación del epitelio celómico, lo que da origen a los cordones testiculares. Por otro lado, el ovario se diferencia por una segunda proliferación del epitelio celómico, lo que da origen a los cordones ováricos.

Grop y Ohno (1966), Upadhyay y Zamboni (1982), sugieren que las células derivadas del mesonefros adyacente contribuyen sustancialmente en los diferentes tipos celulares de la gónada. Estos autores proponen, que las células epiteliales de los cordones sexuales son derivados del epitelio de algunos túbulos mesonéfricos. En contradicción a esta idea, se ha propuesto que las

células epiteliales de la gónada tienen un origen múltiple: mesénquima, mesotelio y algunos túbulos mesonéfricos. Estos últimos, sin embargo, formarían el *rete testis* en los machos y el *rete ovarii* en las hembras (Merchant, 1975; Wartenberg, *et al* 1991).

C) *Diferenciación sexual de la gónada*

La diferenciación sexual es uno de los fenómenos biológicos más trascendentales, ya que se asegura la perpetuación de las especies con reproducción sexual, siendo a la vez uno de los procesos más complejos. El dimorfismo sexual es el resultado de una secuencia de eventos que ocurren en las fases más tempranas de la vida, todos ellos conjugados con un alto grado de precisión en cuanto a sus mecanismos de regulación.

La primera hipótesis para explicar la diferenciación sexual de la gónada de los vertebrados fué propuesta por E. Witschi en 1951. Se conoció como la hipótesis del antagonismo corticomedular. Dicha hipótesis supone la existencia de dos sustancias presentes en la gónada: la cortexina, producida por la corteza y la medularina, producida por la médula. De tal manera que se diferenciará un ovario si la corteza tiene una proliferación más abundante, o un testículo si la proliferación es mayor en la zona medular.

Dicha hipótesis prevaleció por más de 20 años, hasta que se propusieron otros factores como responsables de la diferenciación sexual. Wachtel *et al*, (1975), propusieron al antígeno de histocompatibilidad H-Y como responsable de la diferenciación de la gónada hacia testículo. Ellos observaron que individuos con cariotipo XY presentaban dicho antígeno, (Silver, Wachtel 1977; Ohno, *et al*; 1979). Sin embargo, al ampliar el número de casos, se observó que existían individuos machos que carecían del antígeno H-Y y hembras con ovarios normales que poseían dicho antígeno, por lo que finalmente se descartó a este factor como el responsable de la diferenciación testicular.

Posteriormente se propuso al gene ZFY como el regulador de la síntesis del factor determinante testicular llamado TDF (*Testis Determining Factor*) en humanos y Tdy (*Testis determining gene-Y*) en ratón (Hawkins, *et al*. 1991), sin embargo, diversas evidencias permitieron descartarlo como el regulador del TDF.

Recientemente se ha logrado un gran avance en la identificación del factor determinante del testículo, situado en el brazo corto del cromosoma "Y". En el caso del ratón a partir de los 10.5 *dpc* se inicia la expresión de dicho factor, denominado Sry en ratón (Koopman *et al*, 1990) y SRY en humanos (Berta *et al*, 1990). La expresión de este gen, en el ratón, se continúa hasta los 12.5 *dpc*, momento en el cual se inicia la diferenciación histológica del testículo. La identidad de este gen se confirmó cuando el Sry se transfirió hacia animales transgénicos y fue capaz de inducir la formación de testículos en hembras genéticas (Koopman, *et al*; 1991).

En los mamíferos, el testículo es el primero en diferenciarse histológicamente, mientras que el ovario permanece un tiempo con la apariencia de gónada indiferenciada. En el caso del ratón, los primeros indicios de diferenciación ovárica se registran un par de días después de la diferenciación testicular, a los 14 *dpc* .

2.1.3 Diferenciación del testículo

La diferenciación del testículo se inicia cuando los cordones sexuales, ahora denominados cordones seminíferos son separados del epitelio celómico por acción del mesénquima y vasos sanguíneos provenientes del mesonefros adyacente (Merchant *et al*; 1993). Los cordones seminíferos están formados por dos tipos celulares: las células precursoras de Sertoli y las CGP, estas últimas dan origen a los espermatozoides en el adulto. Las células del estroma que rodean a los cordones testiculares se diferencian para formar varios tipos celulares: las células mioideas, fibroblastos, endotelio y células de Leydig. Estas últimas producen testosterona, que induce el desarrollo de los conductos de Wolff, que darán origen a los genitales internos. Para la formación de los genitales externos, sólo se requiere de la testosterona, la cual es biotransformada en 5α -dihidrotestosterona.

La diferenciación del testículo se encuentra relacionada con el fenotipo del macho. Las células de Sertoli secretan la hormona inhibidora de los conductos de Müller (Magre y Jost, 1980; Josso y Picard, 1986), que como su nombre lo indica, inhibe el desarrollo de los conductos de Müller.

Las células germinales en el testículo reciben el nombre de proespermatozonias (Hillscher y Hillscher, 1978). Este tipo celular presenta características que indican que entraron a otra etapa de su diferenciación, representado por un período de reposo mitótico que mantienen hasta la pubertad. Las células germinales (CG) después de la diferenciación testicular temprana presentan puentes citoplasmáticos que se originan por citocinesis incompleta; estos puentes son conservados por las CG y desaparecen cuando se diferencian en espermatozoides (Gondos, 1984).

2.1.4 Diferenciación del ovario

En etapas tempranas de la diferenciación gonadal del ratón, el ovario no muestra cambios con respecto a la estructura de gónada indiferenciada, sólo se puede observar un cierto crecimiento debido a la proliferación de células somáticas y germinales a los 12.5 *dpc*. Así, tenemos que alrededor del 14 *dpc*, las CGP llevan a cabo una diferenciación fisiológica al iniciar la meiosis.

Algunos estudios realizados en rata y ratón mostraron que la presencia de las CGP no es una condición necesaria para el establecimiento de la gónada indiferenciada ni para su diferenciación sexual temprana (Merchant, 1975a, Merchant y Centeno, 1981). Las células germinales en el ovario (ovogonias) inician un período de proliferación activa que termina con el inicio de la meiosis. Las ovogonias presentan puentes citoplásmicos que tienen una función muy importante en la sincronización de la meiosis (Gondos, 1984). Los puentes citoplásmicos en las ovogonias desaparecen con la formación de los folículos primarios.

El ratón presenta lo que denominamos meiosis inmediata, es decir, que comienza un poco después de la diferenciación sexual de la gónada (Byskov, 1979). Según Brambell (1927), entre los 13 y 14 *dpc* se observan ovocitos en las primeras etapas de la profase I de la división meiótica. En éstas se observan en el núcleo hebras finas de cromatina unidas a la membrana nuclear (Zamboni, 1972). Entre los 15 y 16 *dpc* la mayoría de los ovocitos se encuentran en las etapas de cigoteno y paquiteno, esta última representada por la presencia de complejos sinaptonémicos,

formados por el acoplamiento de los cromosomas homólogos. Es durante estas dos etapas que ocurre un proceso de degeneración de algunos ovocitos.

En el ratón ocurren tres eventos primordiales después del nacimiento: 1) Formación de folículos (foliculogénesis). 2) Detención de la meiosis en el diploteno de la primera división meiótica y 3) Diferenciación del tejido esteroidogénico.

2.2 FOLICULOGÉNESIS

Durante la diferenciación del ovario, un evento directamente relacionado con la meiosis es la foliculogénesis, que normalmente se define como la formación de folículos primordiales en el ovario de los mamíferos.

Byskov *et al* (1973) y Byskov, (1975 y 1977), proponen que existe una asociación continua de los cordones sexuales con algunos túbulos mesonéfricos. Esta asociación forma una sola estructura que ellos llaman el *rete ovarii*, el cual se dividió en tres regiones: extraovárica, de conexión e intraovárica. Aunque estos autores asumen una contribución de las células del epitelio superficial en algunas especies de mamíferos, ellos describen la formación de folículos primordiales como un proceso de "migración" de células pregranulosas desde el *rete extraovarico* hasta el *intraovárico*.

Sin embargo, en estudios *in vitro*, realizados por Odor y Blandau (1971) en gónadas sin mesonefros observaron que hay formación de folículos primordiales, lo que pone en duda el papel del *rete ovarii* en el proceso de foliculogénesis.

Merchant (1978, 1984) propone que las células foliculares se originan del blastema gonadal. Las células del epitelio interno rodean en un principio a los ovocitos formando los cordones ovígeros. Estos cordones son fragmentados por invasión del tejido estromático y de los vasos sanguíneos. Los ovocitos son individualizados primeramente en la región medular siendo éstos los primeros folículos formados. La fragmentación total de los cordones en la región cortical se inicia más tardíamente, siguiendo el mismo mecanismo que en la médula.

En base a estas observaciones, el proceso de foliculogénesis se ha dividido en tres etapas (Merchant y Chimal, 1989; Chimal, 1987): [Fig.3]

A) Los ovocitos se encuentran agrupados haciendo contacto directo entre sí en el interior de los cordones sexuales.

B) Los ovocitos son separados dentro de los cordones por células epiteliales.

C) Los ovocitos y las células epiteliales prefolliculares rodeadas por una lámina basal son separados por células del estroma.

La formación de folículos «ovocitos individualizados rodeados por una capa de células foliculares y una lámina basal» es dependiente de la presencia de ovocitos. Su ausencia impide que los folículos se formen en el ovario (Merchant, 1976; Merchant y Centeno, 1981). La presencia de conexiones interfoliculares en los ovarios del ratón infantil (Merchant y Zamboni, 1972) y la morfogénesis de ovario estériles (Merchant, 1976; Merchant y Centeno, 1981) hizo reconsiderar los mecanismos involucrados en la foliculogénesis.

Si el concepto de homología embrionaria entre los cordones sexuales del testículo y el ovario es correcta (Gruenwald, 1942; Paranko, 1987) entonces, la foliculogénesis puede ser considerada como un problema de interacción entre los ovocitos y las células somáticas para que ocurra la "compartimentalización" de los cordones sexuales.

Conforme crecen los folículos primordiales, se diferencian varios tipos celulares. Primero aparece la teca interna, formada por células mioideas, fibroblastos y células esteroidogénicas. Por fuera de la teca interna se forma la teca externa conformada por tejido conectivo fibroso. Estos tipos celulares hacen del folículo ovárico una unidad funcional.

La mayoría de los folículos sufren el proceso de atresia folicular, que parece jugar un papel importante en la diferenciación del tejido intersticial esteroidogénico del ovario conocido con el nombre de "glándula intersticial". La atresia folicular ocurre en cualquier momento de la vida del organismo y parece ser que algunas células de la teca interna que rodean al epitelio folicular se hipertrofian y forman pequeños cúmulos de células esteroidogénicas localizadas en el estroma.

THE PROCESS OF FOLLICULOGENESIS

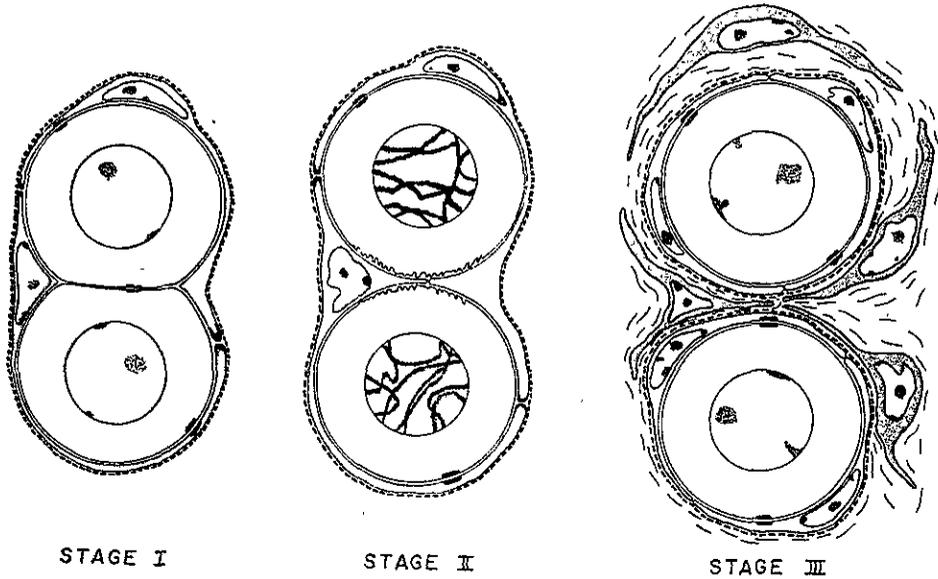


Fig.3 Esquema que muestra las tres etapas de la foliculogénesis en mamíferos.

Estado I (ovocito). Los ovocitos están haciendo contacto directo entre sí en el interior de los cordones sexuales. Estos ovocitos están rodeados por células epiteliales (amarillo), separadas del estroma por una delgada lámina basal (línea punteada).

Estado II (epitelial). Se observa como los ovocitos son separados dentro de los cordones por células epiteliales.

Estado III (estromático). En esta etapa los ovocitos junto con las células epiteliales y la lámina basal que los rodea son individualizados por tejido estromático (azul).

[Merchant-Larios, H. and Chimal-Monroy, J. (1989)].

2.2.1 Detención de la meiosis

En la gametogénesis existe una gran similitud durante el fenómeno de la meiosis en ambos sexos. Pero si bien la espermatogénesis se desarrolla rápidamente sin período de interrupción entre los diversos estadios, la ovogénesis por el contrario, se realiza mucho más lentamente, con períodos de reposo que pueden ser del orden de años.

En la ovogénesis, la profase I de la meiosis se inicia en el núcleo de los ovocitos primarios y permanece bloqueada en la etapa de díploteno. En esta etapa se lleva a cabo el entrecruzamiento de los cromosomas homólogos, el nucleolo es más grande y presenta una apariencia compacta (Zamboni, 1972). En el ratón la meiosis se detiene en el estado "dictiado". Se ha propuesto que el contacto entre ovocitos y células foliculares juega un papel importante en la detención de la meiosis (Ohno y Smith, 1964). Byscov (1978) señala la existencia de un factor inhibidor de la meiosis secretado por las células foliculares. Sin embargo, hacen falta evidencias experimentales que apoyen esta hipótesis.

2.2.2 Células esteroidogénicas y su origen

En el ratón la diferenciación del tejido esteroidogénico depende de la formación de folículos, y por lo tanto de la presencia de células germinales (Merchant, 1984). Las primeras células con características de síntesis de esteroides aparecen pocos días después del nacimiento (Pheleman y Lombard, 1978). Los estudios realizados en ratas con busulfán (droga que selectivamente destruye a la CGP), sugieren que el proceso de atresia folicular, es de gran importancia para la inducción de la diferenciación del tejido intersticial esteroidogénico (Merchant y Centeno, 1981).

En todas las especies de mamíferos existen dos tipos celulares básicos involucrados en la esteroidogénesis folicular: a) células sensibles a la hormona Luteinizante (LH), que comprenden células de la teca interna y células intersticiales del estroma ovárico, y b) células sensibles a la hormona folículo estimulante (FSH), formadas únicamente por células de la granulosa, las cuales sólo en etapas más avanzadas de maduración folicular adquieren la habilidad para responder a la LH. Estos dos tipos celulares

presentan diferentes requerimientos en el proceso de la esteroidogénesis debido a su control hormonal y su diferente expresión de enzimas esteroidogénicas.

Las células de la teca parecen diferenciarse de células mesenquimáticas en el estroma ovárico (Garza *et al*; 1984). Debido a que en folículos primarios no se encuentran células de la teca, sino que éstas se diferencian en folículos en crecimiento y maduros, es evidente que las células de la teca surgen conforme se alcanza la vida reproductiva; las células progenitoras mesenquimáticas son quizás células pluripotenciales que también contribuyen a formar el tejido conectivo. Esto sugiere que en el ratón neonatal la teca también pudiera estar formada por células del rete intraovárico que inicialmente se encuentran contiguas a células que forman las células de la granulosa, pero que son separadas conforme el folículo es formado (Quattropani, 1973). Sin embargo, estas células en el ratón parecen dar origen principalmente a células intersticiales primarias (Hoyer y Byscov, 1981).

Las células intersticiales secundarias en el ovario adulto son derivadas de las células de la teca de folículos atrésicos (Guraya y Greenwald, 1968). Mientras que el ovocito y las células de la granulosa de un folículo atrésico degeneran y son eliminadas del ovario, las células tecales en la envoltura folicular sobreviven como pequeñas islas de tejido esteroidogénico en el estroma del ovario.

En base a esto, se puede pensar que las células de la teca y las células intersticiales del ovario adulto presentan funciones similares. Sin embargo, las células intersticiales y de la teca no tienen propiedades de biosíntesis idénticas, ya que las células intersticiales, en contraste con las células de la teca, son poco influidas por sustancias reguladoras paracrinas secretadas por la membrana de la granulosa; en su lugar, ellas podrían recibir inervaciones simpáticas.

2.2.3 Desarrollo de la glándula intersticial

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

Posteriormente Merchant (1975,1976) y Merchant y Centeno (1981), al realizar estudios con ratas tratadas con busulfán y una cepa de ratón mutante estéril (W/W), encontraron que la presencia de ovocitos en el ovario parece ser necesaria para la formación de folículos y consecuentemente para la diferenciación estructural de las células secretoras de esteroides. De tal manera que, la presencia de CGP en el ovario induce la foliculogénesis, y como consecuencia del proceso de atresia folicular se inicia la diferenciación del tejido intersticial glandular.

Pelloux *et al* , (1988) confirmaron las observaciones anteriores al inyectar busulfán a ratas gestantes, los productos presentaban una reducción en el número de células germinales. Además observaron que los niveles de estrógenos, así como la actividad enzimática de la aromatasas P-450 y de la Δ^5 - 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa (HSD) eran bajos comparados con los animales normales.

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

Numerosas investigaciones (Levy *et al*; 1959 ; Ireland y Richards, 1978; Funkenstein *et al* ; 1980; Peluso, 1989), han demostrado que tanto la diferenciación postnatal de las células que integran el tejido intersticial glandular, como su estado de funcionalidad, depende de la presencia de gonadotropinas hipofisarias (LH Y FSH). No obstante, el papel exacto de éstas sobre el inicio de la foliculogénesis y de la diferenciación del tejido intersticial se desconoce. Una de las primeras evidencias fue dada por Rennels en 1951, quien demostró que los andrógenos secretados por el ovario bajo la influencia de gonadotropinas exógenas, eran producidos por las células del tejido intersticial glandular; como respuesta a estas hormonas, se diferenciaban y presentaban cambios citológicos (membranogénesis), histológicos (aumento de tamaño del ovario) y bioquímicos (aumento en la capacidad esteroideogénica), mismos que actualmente se asocian a una acelerada producción de hormonas esteroides (Guraya, 1973).

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

2.3 ESTEROIDOGÉNESIS

En los mamíferos, existen dos vías de biosíntesis de esteroides comúnmente conocidas como: vía $\Delta 5$ y $\Delta 4$.

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

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

Este precursor es desdoblado mediante una serie de enzimas hasta transformarlo en pregnenolona, la cual es una intermediaria común en todas las clases de hormonas esteroides producidas tanto por los ovarios como por otros tipos de órganos esteroidogénicos (Gore-Langton y Armstrong, 1988). La pregnenolona es a su vez convertida a progesterona por el complejo enzimático $\Delta 5$ - 3β hidroxisteroide deshidrogenasa ($\Delta 5$ - 3β HSD). Esta vía de síntesis de esteroides es común para todos los vertebrados (Collenot y Collenot, 1977).

Dicho complejo ($\Delta 5$ - 3β HSD) no sólo transforma pregnenolona a progesterona sino también 17 α -hidroxipregnenolona a 17 α -hidroxiprogesterona y dehidroepiandrosterona a androstenediona; estas dos últimas conforman la cadena de derivados esteroidogénicos que finaliza con la producción de estrona, testosterona y estradiol en el ovario. [Fig.4]

La actividad del complejo enzimático ($\Delta 5$ - 3β HSD) es indispensable para llevar a cabo la producción de hormonas esteroides, por lo que se le considera como un marcador fisiológico precoz de las células esteroidogénicas, el cual a su vez, está influido por la edad, el sexo, los fenómenos cíclicos, la dieta y el estrés, entre otros (Goldman *et al*; 1972).

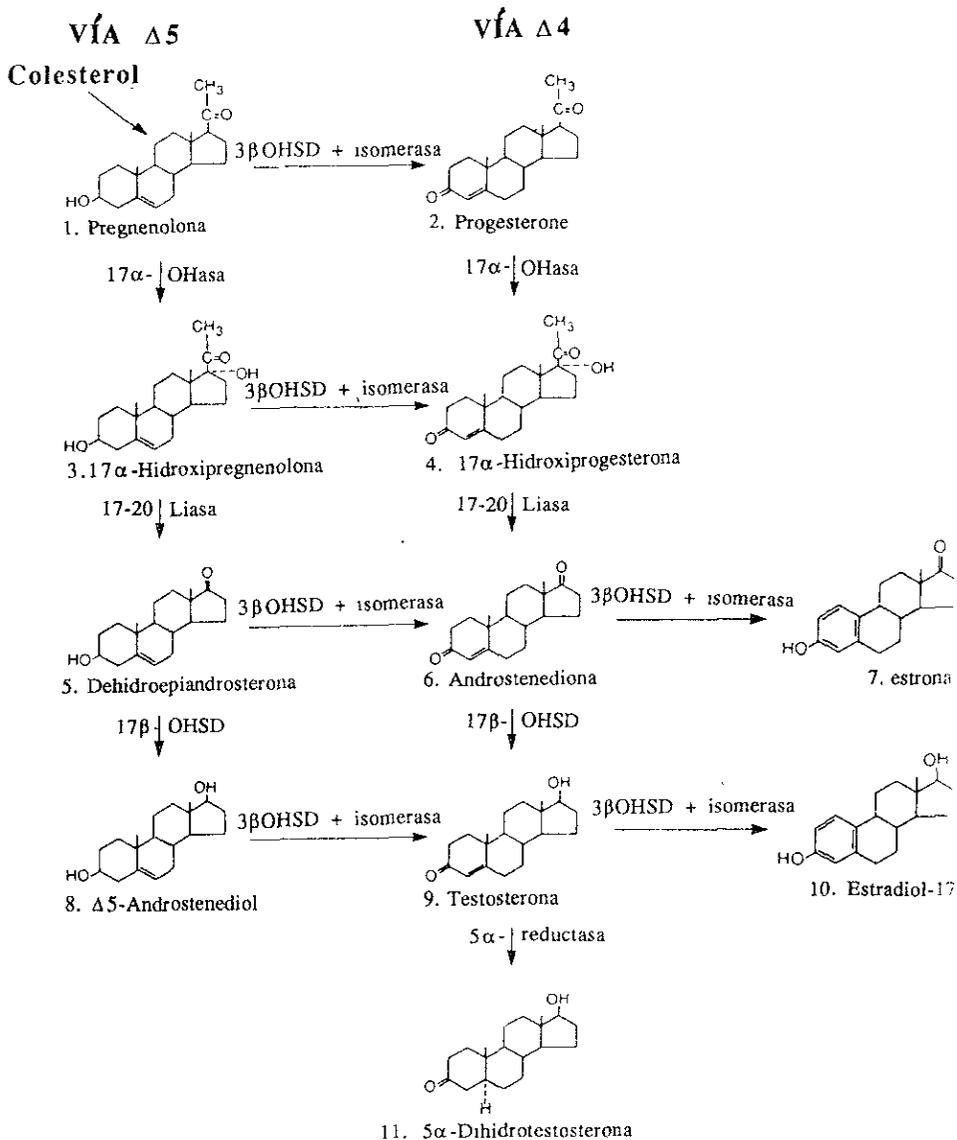


Fig.4 Esquema de la síntesis de esteroides de las vías $\Delta 5$ y $\Delta 4$.

Los primeros indicios de actividad esteroidogénica observada mediante técnicas histoquímicas en el ovario de mamífero, se advierten en las células intersticiales localizadas en la región medular (Hoyer y Byscov, 1981). La edad de la aparición depende de la especie en estudio. En el caso de la rata, se ha demostrado que el ovario *in situ* es capaz de sintetizar esteroides desde los primeros días de vida postnatal (Rennels, 1951; Weisz y Gonsalus, 1973; Hoyer y Byscov, 1981). En esta edad el tejido intersticial inicia su diferenciación y la producción de esteroides aumenta con el incremento de la actividad enzimática hasta obtener un máximo a partir de la segunda semana de vida postnatal (8 a 10 *dpp*) (Schlegel *et al*; 1967).

2.3.1 Control de la esteroidogénesis

Se ha observado que el almacenamiento y uso del colesterol en el ovario de los mamíferos, está directamente influido por la gonadotropina hipofisiaria coriónica humana (hCG), la cual facilita la esteroidogénesis (Guraya, 1975). Esta es evidente por el incremento en la actividad enzimática en los ovarios de rata, así como, por la agilización del transporte de colesterol que se encuentra almacenado en las gotas lipídicas (las cuales desaparecen del tejido intersticial poco después del tratamiento con hCG) hacia las mitocondrias o sitios de su utilización (Tuckey *et al*; 1984; Gore-Langton y Armstrong, 1988).

Los trabajos de Levy *et al*; (1959); Crumeyrolle- Arias y Ascheim, (1976) y Burden y Lawrence (1977) entre otros, mostraron que en ratas hipofisectomizadas, las gonadotropinas hipofisiarias juegan un papel muy importante en la diferenciación bioquímica del tejido intersticial glandular. Una vez realizada la hipofisectomía, la actividad del complejo enzimático $\Delta 5-3\beta$ HSD: 5-4 cetoesteroide isomerasa desaparece por completo. Por otro lado en ratas hipofisectomizadas y simultáneamente tratadas con gonadotropinas exógenas, la actividad enzimática es similar a la encontrada en ratas control.

La investigación realizada por Kent y Ryle (1975) señala que el tejido intersticial sólo es estimulado por LH y hCG, pero no por la FSH. Sin embargo, los estudios realizados por Susuki *et al*. (1978) sugieren que a su vez, la FSH posee cierta capacidad para inducir

esteroidogénesis, puesto que cuando se suministra su análogo **PMSG** (Gonadotropina de Suero de Yegua Preñada), la actividad enzimática de la $\Delta 5-3\beta$ HSD y la 17β -HSD se incrementan.

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

2.3.2 Control de la esteroidogénesis *in vitro*

En cultivo de órganos, los ovarios de rata fetales e infantiles en presencia de dehidroepiandrosterona, muestran cierta producción de estradiol y de otras hormonas esteroides desde los 13 a 14 días de gestación (*dg*) (Picon, 1985), por lo tanto se sugiere que la actividad de la $\Delta 5-3\beta$ HSD se encuentra presente en las gónadas fetales femeninas. Además, se ha observado que la adición de la LH a cultivos de ovarios de ratas neonatales e infantiles ocasiona un incremento considerable en la producción de esteroides (Ireland y Richards, 1978; Funkenstein *et al*; 1980), así como la actividad del complejo enzimático $\Delta 5-3\beta$ HSD: 5-4 KSI (Goldman y Kohn, 1970).

2.3.3 Gonadotropina del Suero de Yegua Preñada (PMSG)

El descubrimiento de Harol Cole, en el año de 1930, de que la sangre de las yeguas preñadas contenía niveles altos de gonadotropina, proporcionó la primera fuente comercial de hormona estimulante del folículo más fácil de obtener; la PMSG (Gonadotropina del Suero de Yegua Preñada). Esta hormona proteínica es secretada en grandes cantidades en las criptas endometriales de los úteros de la yegua y de la hembra del asno preñadas, cuyo peso molecular es mayor que el de cualquier otra gonadotropina (alrededor de 70 000). Su elevado peso molecular junto con el contenido tan grande de carbohidratos (de 49% con 10.4% de ácido siálico) dificultan su eliminación de la circulación y son la causa de su vida media tan prolongada y de su gran concentración. Tiene propiedades parecidas a las de la FSH y a las de la LH con predominio de la primera.

Cuando en el año de 1934, Bernhard Zondek publicó que los sementales excretaban estrógenos por la orina se tuvo la primera indicación de que la producción hormonal de ambos sexos era más bien relativa que absoluta y cuantitativa más que cualitativa.

Aunque es un hecho bien conocido que la placenta fetal puede producir hormonas gonadotrópicas durante el embarazo en muchas especies, la yegua parecía ser la excepción a la regla; se sabía que la PMSG se produce en unas estructuras que tienen forma de úlceras que se encuentran en la superficie interior del útero -las criptas endometriales- por lo tanto, se supuso que esta hormona era de origen materno.

Hacia el cuadragésimo día del desarrollo del embrión del caballo se empieza a ver a simple vista el tejido que forma las criptas como una banda que corre alrededor de la circunferencia del cuerno uterino embarazado y aparece por primera vez la PMSG en la circulación sanguínea materna. Los niveles de gonadotropina alcanza su máximo cerca del sexagésimo día. Puede haber más de un millón de unidades internacionales (UI) de PMSG circulando en cualquier momento y, aunque la cantidad sea tan grande, rara vez causa hiperestimulación de los ovarios maternos. Lo que sí provoca es la formación de cuerpos lúteos accesorios, ya sea por ovulación o por luteinización de folículos intactos, los cuales pueden actuar como una fuente suplementaria de progesterona.

Si una yegua aborta después del trigésimo quinto día de gestación, cuando las células fetales ya han invadido el endometrio, las criptas continúan desarrollándose normalmente y secretan PMSG, por lo que se puede mantener los cuerpos lúteos que se encuentran presentes. Esto nos sugiere que la PMSG puede tener una acción luteotrópica, lo que es obvio esperar de una sustancia que posee la acción de FSH y de la LH en una sola molécula. (Austin y Short,1982).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que a partir de un tamaño crítico, la maduración endócrina de los folículos depende de factores extragonadales como las gonadotropinas. Sin embargo, los mecanismos intragonadales que controlan la formación de los folículos primordiales, su selección para iniciar su crecimiento y la diferenciación de las primeras células esteroidogénicas durante la ontogenia, están todavía por dilucidarse.

En el ovario del ratón, la mayoría de los folículos primordiales se forman durante los primeros tres días después del nacimiento. La aparición del tejido esteroidogénico tiene lugar durante la primera semana. De manera que durante este período se establecen los mecanismos fisiológicos que modulan el inicio de la foliculogénesis y la diferenciación endócrina del ovario. De tal manera que en el presente trabajo se estudió el desarrollo *in vitro* de ovarios aislados los días 1 y 3 postnatales y evaluamos su respuesta a gonadotropinas en cada uno de estos días.

IV. OBJETIVOS

*** Objetivo General**

Determinar el efecto de la gonadotropina del suero de yegua preñada (PMSG) en la diferenciación de tejido intersticial del ovario del ratón.

*** Objetivos Particulares**

1. Evaluar cualitativamente la respuesta a gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG), sobre la diferenciación de células esteroideogénicas de ovarios en las diferentes etapas de la foliculogénesis.
2. Cuantificar los niveles de hormonas esteroideas de las vías $\Delta 5$ y $\Delta 4$, como respuesta a gonadotropina mediante la técnica de radioinmunoanálisis (RIA).
3. Establecer si el proceso de individualización folicular (foliculogénesis) depende de las gonadotropinas o de otros factores extragonadales.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Animales

Para este estudio se utilizaron ovarios de ratón neonatal de la cepa CD-1, de 1 y 3 días postparto (*dpp*). Así como ovarios de 10 *dpp* como controles.

Se colocaron tres hembras jóvenes con un macho semental durante toda la noche. A la mañana siguiente, se revisaron y separaron las hembras que presentaban un tapón vaginal (formado por las secreciones de las glándulas coagulantes del macho que obstruyen el orificio vaginal), señal de que hubo cópula. Se consideró como día cero de gestación el día que se registró la presencia del tapón vaginal. El nacimiento de las crías fue el día 19 postcoito.

5.2 Obtención de las gónadas

Los ratones postnatales se limpiaron en una campana de flujo laminar con una solución antiséptica y en condiciones de esterilidad se sacrificaron por decapitación, se colocaron sobre una plancha de hule donde se les realizó un corte sagital abarcando la región media caudal del ratón y dejando expuesta la cavidad abdominal donde se localizó el tracto reproductor femenino.

Con unas microtijeras se disectaron los ovarios y se colocaron en una caja de Petri con medio Leibovitz's L-15, se les cortó la cápsula ovárica para dejarlos expuestos y colocarlos en cultivo. [Fig.5].

5.3 Cultivo de órganos

Los ovarios libres de la cápsula ovárica de 1 y 3 *dpp*, se colocaron en cultivo de órganos en pozos (Cell Culture Cluster, COSTAR), sobre un filtro de policarbonatos de 1µm de abertura de

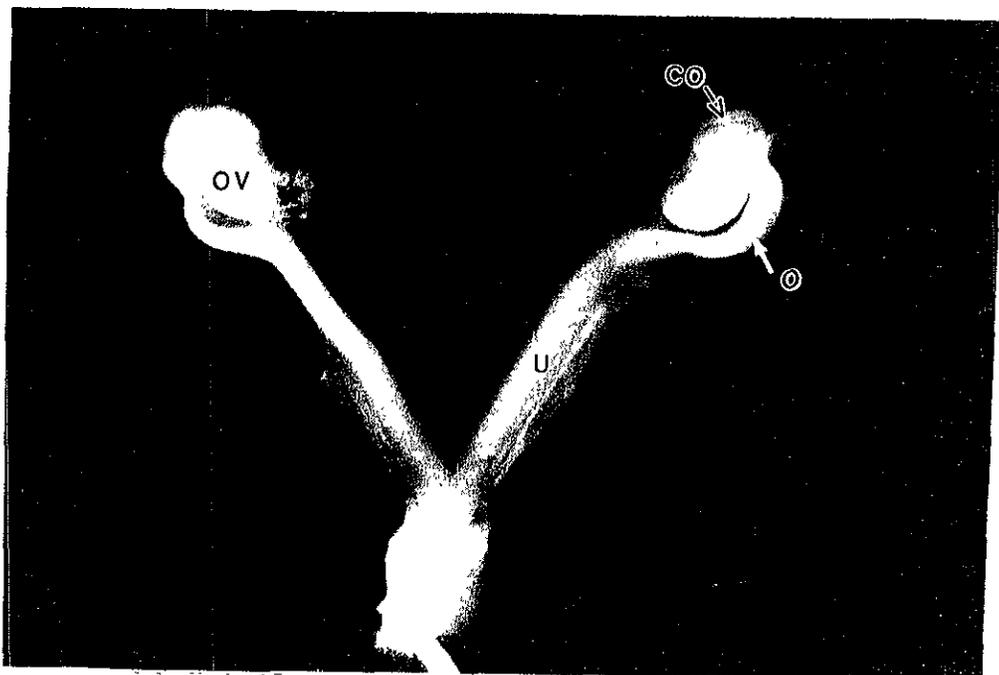


Fig.5 Fotografía de la obtención del tracto reproductor femenino de ratón neonatal. Los ovarios (OV) se disecaron y se liberaron de la cápsula ovárica (CO), dejándolos expuestos para colocarlos en cultivo de órganos.

poro (nucleopore), flotando sobre 0.5 ml de medio de cultivo con los siguientes componentes: medio Mc Coy modificado (Microlab), 10% de suero de bovino fetal (Sigma), 200 U/ml de penicilina (Microlab) y 200 μ g/ml de estreptomycin (Microlab). Los cultivos se llevaron a 10 días en una estufa a 37°C con una atmósfera húmeda y 5% de bióxido de carbono. Estos se utilizaron como grupos control.

Por otro lado se cultivaron ovarios de las mismas edades y en las mismas condiciones, pero añadiendo al medio de cultivo 50 UI de gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) [Folligon].

5.4 Actividad histoenzimática de la $\Delta 5-3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ($\Delta 5-3\beta$ -HSD)

Esta técnica descrita por Levy *et al.*, (1959) se emplea para determinar la localización y abundancia de enzimas y otros compuestos relacionados con el metabolismo de esteroides. La demostración de la actividad enzimática depende de la transferencia de hidrógenos del hidroxiesteroide a la sal de tetrazolio, vía un nucleótido de piridina (NAD⁺), de esta manera la sal se reduce y puesto que la forma reducida es insoluble y coloreada (sal de formazán), se deposita en el sitio de la reacción permitiendo la localización de ésta.

La reacción de la $\Delta 5-3\beta$ -HSD se aplicó a ovarios *in situ* e *in vitro* con y sin PMSG. Los tejidos se incluyeron en cápsulas Beem con Tissue-Tek y congelaron a -70°C en hexano dentro de una cámara con hielo seco. Se obtuvieron cortes de 7 μ m de espesor en un criostato JUNG CM 3000 (Leica), los cuales fueron montados en laminillas con Vectabond (Vector) y puestos en vacío por 10 minutos.

Posteriormente se incubaron a 37°C con el medio de control compuesto de 20 mg de β - Nicotin Adenin Dinucleótido (β -NAD), 10 mg de Nitro Blue Tetrazolium (NBT) y 20 ml de amortiguador de tris 0.2 M a pH de 7.6 (todo de Sigma), o con el medio de detección agregando al medio de control 2 mg de Dehidroepiandrosterona (DHEA) [Sigma] durante 1 hora. Las laminillas se lavaron con agua destilada, se fijaron con formalina neutra por 5 minutos y se montaron con PBS-glicerol 1:9.

buffer de cacodilatos 0.1 M con un pH de 7.4. Se postfijaron en una solución 1% (v/v) de tetraóxido de osmio (Zetterqvist, 1956) durante una hora a 4°C.

Las muestras se lavaron después de la postfijación con agua destilada; se deshidrataron con alcoholes graduales: 70%, 80%, 90%, 95%, 10 minutos cada uno; alcohol absoluto, dos cambios de 10 minutos. Posteriormente se pasaron a óxido de propileno durante 20 minutos. Se impregnaron en una mezcla de Epón 812-óxido de propileno en una proporción 1:1, durante una hora. Epón-óxido de propileno 2:1 y finalmente en epón 812 durante 2 horas. La deshidratación e impregnación se realizaron a temperatura ambiente. Se incluyeron en epón 812 (Luft, 1961) y se dejaron 12 horas a 60°C para la polimerización de la resina.

Para el análisis histológico, se obtuvieron cortes semifinos (1µm de espesor) en un ultramicrotomo NOVA LKB, se tiñeron por flotación con azul de toluidina al 0.5% y se montaron en porta objetos para su estudio en microscopía de luz. Las observaciones y tomas de fotografías se realizaron en microscopio de luz OPTIPHOT (NIKON). Con un rollo de película Ektachrome 100 HC.

5.7 Determinación cuantitativa de los esteroides intermediarios de las vías $\Delta 5$ y $\Delta 4$.**

A) Preparación de la muestra

Para este trabajo se utilizaron 3 grupos de 4 ovarios de ratón neonatal de 1, 3 y 10 *dpp*, se colocaron en tubos eppendorf sin medio de cultivo y se congelaron a -70°C. El método de radioinmunoanálisis para la detección de pregnenolona (P5), 17 α hidroxipregnenolona (17 α HP5), Dihidroepiandrosterona (DHEA), Progesterona (P4), 17 α hidroxiprogesterona (17 α HP4), Androstenediona (A), Testosterona (T) y Estradiol (E2) se basó en estudios previos realizados por Mendieta *et al* (1991).

Se prepararon tubos de centrifuga de 15 ml con tapón esmerilado, con trazadores \pm 100 cpm en un volumen de 10 µl cada uno. También se colocaron en viales los controles; las muestras tienen que estar completamente descongeladas pero sin calentarse más allá de la temperatura ambiente.

B) *Extracción*

A los tubos ya preparados se les agregó 5 ml de éter dietílico, se agitaron en el Vórtex durante un minuto dejando separar las fases acuosa y etérea. Se colocaron en un baño crioscópico preparado con hielo seco y acetona, se introdujeron los tubos lentamente en la acetona dejando congelar la fase acuosa, posteriormente se dejaron descongelar y se agregaron 5 ml de éter etílico. Esta operación de extracción se repitió reuniendo las dos fases etéreas y finalmente se dejó evaporar el éter.

C) *Separación de los esteroides*

Se prepararon cromatoplasmas de Sílica gel 60, F254, y se transfirió el extracto de cada tubo con una pipeta Pasteur con la punta afilada para que pasara el líquido de transferencia (mezcla de éter etílico: metanol; 9:1).

El extracto se resuspendió en 5, 4 ó 3 gotas de líquido de transferencia. Una vez que se aplicaron las muestras se agregaron 2µg de cada uno de los esteroides estándares a determinar por cromatografía: benceno, benceno y acetato de etilo en proporción 7:3, benceno y metanol en proporción 95:5. Bajo la lámpara de radiación ultravioleta de 254 nm que hace fluorescente la placa; los esteroides con estructura 4-3 cetona los observamos con manchas de color morado, dicha mancha se marcó en el borde con lápiz. Para revelar la presencia de los esteroides que no tienen esta función química, se utilizó el reactivo de Oertel. Ya revelados los estándares de cromatografía se definieron las zonas correspondientes a las muestras por paralaje; para separar los esteroides correspondientes, se raspó la sílica de cada zona, el esteroide se desprendió de la sílica por disolución en 1.0 ml de éter etílico: metanol (9:1), el líquido se recibió en un tubo de vidrio de 10x75 mm.

Del eluido correspondiente se tomaron alícuotas a viales de conteo marcados en forma idéntica que los tubos de elución, la proporción de la alícuota dependió de las cantidades de esteroides que se esperaban para el radioinmunoanálisis, pero en cualquier caso la alícuota transferida a los viales es al menos la mitad. A estos viales con la alícuota de recuperación se les dejó evaporar el disolvente y se agregó líquido de centelleo y se contaron acompañados de los controles correspondientes.

D) Radioinmunoanálisis (RIA)

El radioinmunoanálisis (RIA) es un método microanalítico que incluye la aplicación de radioactividad y reacciones químicas específicas, mediante proteínas inducidas (anticuerpos), que nos permiten cuantificar los niveles de hormonas esteroides en el plasma.

Se separaron tubos de vidrio de 10x75 mm etiquetados igual que los tubos de elución a los que se agregó la alícuota correspondiente a la cantidad de esteroide supuesta para cada muestra, o como en este caso en particular, se utilizó la otra mitad remanente de cada muestra. Se prepararon tubos para la curva patrón por triplicado que fueron: T, 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000 y 50 000 pg de esteroide puro, semejantes a los utilizados como estándares cromatográficos, pero con soluciones etanólicas. También se preparó una solución que contenía el esteroide radiactivo correspondiente en cantidad suficiente para que cada tubo (muestra y curva) recibieran en 500 µl, aproximadamente de 4500 a 5000 cpm y el anticuerpo correspondiente en la dilución útil seleccionada para el rango de sensibilidad que se requería según la muestra. Todos los tubos se incubaron entre 18 y 24 horas a 4°C, para separar la fracción de esteroides unida a los anticuerpos de la fracción de los esteroides no unida, a cada tubo se le agregó 0.2 ml de una suspensión de carbón activado y dextrán T70 (en cantidades 0.625 y 0.0625%), se centrifugó a 1500 xg, a 4°C durante 15 minutos, se decantó a viales de conteo y se les agregó líquido de centelleo para realizar el conteo.

****Esta técnica se llevó a cabo con la colaboración del Dr. Joaquín Herrera. Sección de Mecanismos de Acción de Hormonas. División de Bioquímica. Departamento de investigación científica. Instituto Mexicano del Seguro Social.**

VI. RESULTADOS

6.1 DESCRIPCIÓN ESTRUCTURAL DE OVARIOS OBTENIDOS *IN SITU*

A) *Ovarios de 1 día postparto (dpp)*

En esta etapa del desarrollo del ovario perinatal del ratón, se observa una gran invasión y proliferación de tejido estromático (mesénquima, fibroblastos y vasos sanguíneos) hacia los cordones ováricos. Esta invasión de células estromáticas permite la fragmentación de los cordones ováricos. Los ovocitos que se encuentran en la región medular han iniciado su crecimiento y en la región de la corteza encontramos grupos de ovocitos en su mayoría en la primera etapa de folículogénesis (I). En la región medular, el proceso de compartimentalización de los ovocitos se encuentra más avanzado (etapa III de la folículogénesis), formándose los primeros folículos primordiales.

Parte de la región mesonéfrica ha envuelto completamente al ovario, formando la cápsula ovárica. El *rete ovarii* es claramente evidente entre la región mesonéfrica y la región del ovario [Fig.6].

B) *Ovarios de 3 dpp*

Hacia los 3 *dpp*, las características morfológicas de los componentes celulares del ovario siguen siendo las mismas que en los de 1 *dpp*. El proceso de crecimiento folicular continúa de una manera gradual desde la región medular hacia la corteza. Las células epiteliales dentro de los cordones ovígeros siguen interponiéndose dentro de los ovocitos, sin que se formen folículos individuales.

En la región medular la presencia de folículos individualizados es bastante clara, como también la separación de los folículos por invasión de mesénquima. Los ovocitos ya iniciaron su crecimiento y las células foliculares comienzan su proliferación para formar los primeros folículos preantrales [Fig.7].

C) Ovarios de 10 dpp

A los 10 dpp se observó que la cantidad de folículos preantrales y antrales aumentó considerablemente, así como, la casi total individualización de los ovocitos con sus células epiteliales correspondientes, formando así la "poza" de folículos primordiales del ovario. Además de la individualización de los folículos, su diferenciación implica crecimiento del ovocito y cambio morfológico de las células foliculares de planas a cúbicas, para dicha observación empleamos la técnica de inclusión en epón-812 para microscopía de luz.

La histología del ovario nos permitió la identificación de células esteroidogénicas. La técnica inmunohistoquímica de la $\Delta 5-3\beta$ -HSD hizo posible evidenciar, mediante el precipitado de formazán, actividad esteroidogénica en células, o pequeños grupos de células, localizadas en el intersticio de los folículos de mayor tamaño hacia la región medular; región donde se lleva a cabo la formación y desarrollo de los primeros folículos [Fig.8]

6.2 Actividad Histoenzimática de la $\Delta 5-3\beta$ - HSD de ovarios tratados in vitro con y sin PMSG.

A) Ovarios de 1 dpp

Al realizar el análisis histológico de los ovarios después de 9 días de cultivo, se observó que todos los eventos que se llevan a cabo durante el proceso de foliculogénesis son similares a los que ocurren *in situ* Por lo que las condiciones de cultivo resultaron ideales para nuestro estudio.

En ovarios cultivados en ausencia de PMSG (Gonadotropina de suero de yegua preñada), el precipitado de formazán hace evidente la presencia de células esteroidogénicas en el intersticio de los folículos de mayor tamaño, que se localizan en la región de la médula. Con esta técnica, donde los cortes se obtienen por congelación, sólo se puede observar algunos ovocitos rodeados por su zona pelúcida [Fig.9].

En el caso de los ovarios cultivados en presencia de PMSG, la reacción de la $\Delta 5-3\beta$ -HSD detecta una intensa reacción positiva. Los gránulos de formazán se localizaron tanto en la zona intersticial alrededor de los folículos, como en células foliculares de algunos folículos que se encuentran unidos entre sí [Fig.10].

B) Ovarios de 3dpp

Los ovarios obtenidos de ratones de 3 dpp se mantuvieron 7 días en cultivo de órganos. La intensidad y distribución de células esteroidogénicas, detectadas por la actividad de la $\Delta 5-3\beta$ -HSD es similar en ovarios tratados *in vitro* sin PMSG como en los tratados con la hormona PMSG [Fig.11]. También es evidente que no existen diferencias entre la cantidad de células esteroidogénicas, cuando estos ovarios son comparados con ovarios de 10 dpp desarrollados *in situ* [Fig.12].

6.3 Detección inmunohistoquímica de Laminina en ovarios tratados *in vitro* con y sin PMSG.

La laminina es una glucoproteína sintetizada y secretada por las células epiteliales en las membranas basales desde etapas muy tempranas del desarrollo lo cual permite estudiar el desarrollo temprano de los epitelios. De esta manera, la detección de laminina se empleó para seguir la diferenciación de los cordones sexuales y por consiguiente el mecanismo de la foliculogénesis en las condiciones experimentales de este ensayo. Dicha técnica se realizó a la par de la $\Delta 5-3\beta$ -HSD para observar las dos reacciones juntas en el mismo corte del ovario.

A) Ovarios de 1 dpp

En los cortes obtenidos por congelación, se detectó la presencia de células esteroidogénicas, se realizó inmunohistoquímica de laminina. En el caso de ovarios de 1 dpp y mantenidos 9 días en cultivo de órganos, se observa que en ausencia de PMSG los ovarios se desarrollan, y por consiguiente el mecanismo de la foliculogénesis se lleva a cabo. La laminina hace evidente que los ovocitos que se encuentran en la región medular han aumentado de tamaño, éstos se encuentran individualizados formando unidades foliculares. Hacia la región de la corteza, encontramos ovocitos aún formando grupos, o algunos unidos por puentes interfoliculares comunicantes. [Fig.13].

El precipitado de formazán, que evidencia la presencia de células esteroidogénicas, no se distingue ya que se encuentra enmascarado por la laminina.

En ovarios cultivados en presencia de PMSG, como se mencionó anteriormente, presentan una intensa reacción positiva a la $\Delta 5-3\beta$ -HSD. Se observa que la reacción es positiva sobre todo en células de la granulosa. La presencia de laminina evidencia folículos individualizados rodeados por células intersticiales, así como folículos unidos por puentes interfoliculares formados por células de la granulosa. [Fig.14].

B) Ovarios de 3 dpp

Tanto en ovarios cultivados en ausencia de PMSG y ovarios con la gonadotropina la distribución de laminina hace evidente el desarrollo de folículos primordiales, los cuales son más numerosos hacia la región medular. Claramente se detectan las tres etapas de la foliculogénesis: ovocitos integrados en cordones (etapa I), localizados en la región de la corteza, así como ovocitos unidos por puentes interfoliculares formados por células de la granulosa (etapa II). Los ovocitos individualizados (etapa III), se encuentran rodeados por células intersticiales. [Fig.15].

Por la distribución de laminina, el precipitado de formazán es apenas detectable, sin embargo se observan células esteroideogénicas tanto en el intersticio de folículos individualizados, como en células foliculares que forman puentes interfoliculares [Fig.16].

LÁMINA I

FOLICULOGÉNESIS *IN SITU*

(*Cortes obtenidos por congelación*)

- Fig.6** Corte longitudinal de ovario de ratón de 1 día postparto (*dpp*). En la región medular se observan ovocitos individualizados, que corresponden a la tercera etapa de la folículoogénesis (III). Hacia la región de la corteza hay ovocitos unidos por puentes citoplasmicos (etapa II), así como grupos de ovocitos haciendo contacto entre si (etapa I). La cápsula ovárica (CO) formada por el mesonefros ha envuelto completamente al ovario. 250X.
- Fig.7** Corte longitudinal de ovario de ratón de 3 *dpp*. Se observa en la región medular ovocitos individualizados (III), que ya iniciaron su crecimiento. Los ovocitos que se localizan en la zona más cortical continúan unidos (I), mientras que en la zona intermedia entre la región cortical y medular la mayoría de los ovocitos se encuentran en la etapa II de la folículoogénesis (flechas). 250X.
- Fig.8** Corte longitudinal de la zona medular de ovario de ratón de 10 *dpp*, donde se muestra la detección histoquímica de laminina y la actividad histoenzimática de la $\Delta 5-3\beta$ -HSD. La mayoría de los ovocitos se encuentran individualizados formando los primeros folículos preantrales (FP). Hacia la región de la corteza la mayoría de los ovocitos se han individualizado (etapa III). La reacción de la $\Delta 5-3\beta$ -HSD (precipitado violeta) hace evidente la presencia de células esteroideogénicas localizadas en el intersticio de los folículos de mayor tamaño (flechas). 500X.

LAMINA I

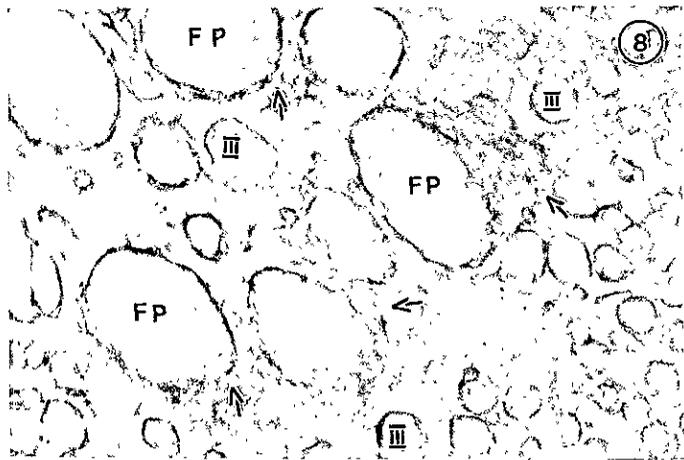
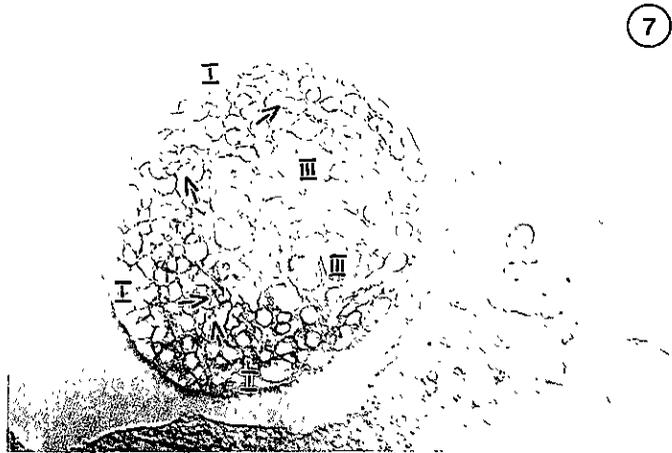
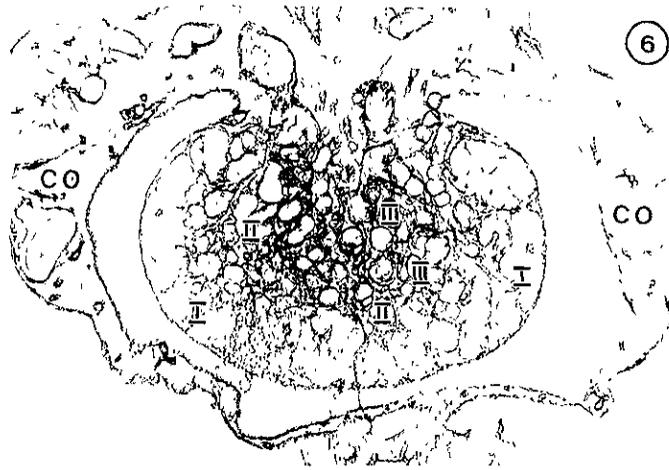
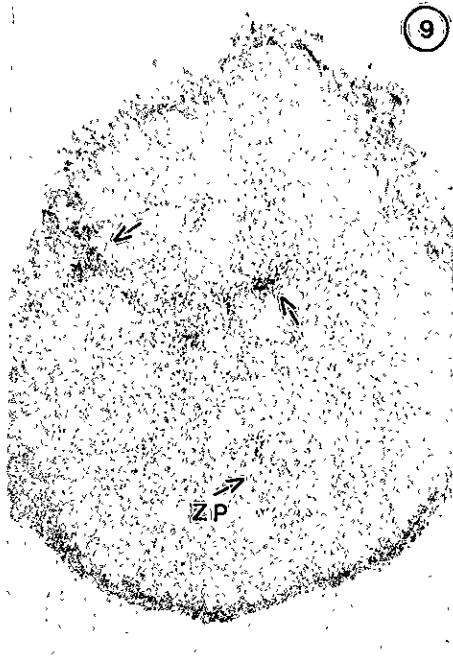


LÁMINA II

ACTIVIDAD HISTOENZIMÁTICA DE LA $\Delta 5-3\beta$ -HSD *IN VITRO* (Cortes obtenidos por congelación)

- Fig.9** Corte longitudinal de ovario de ratón de 1 *dpp* y cultivado 9 días, en ausencia de PMSG. Se observan ovocitos individualizados rodeados por una zona pelúcida (ZP). La reacción de la $\Delta 5-3\beta$ -HSD (precipitado de formazán) hace evidente una muy tenue reacción positiva dispersa entre los folículos (flechas). 250X.
- Fig.10** Corte longitudinal de ovario de ratón de 1 *dpp* y cultivado 9 días, en presencia de PMSG. Es evidente la reacción positiva localizada en la zona intersticial (ZI) de los folículos de mayor tamaño (flechas). 250X.
- Fig.11** Corte longitudinal de ovario aislado a los 3 *dpp* y cultivado 7 días en ausencia de PMSG, la reacción de la $\Delta 5-3\beta$ -HSD se percibe muy tenue y dispersa (flecha). Se observan ovocitos en crecimiento rodeados por su zona pelúcida (ZP). 250X.
- Fig.12** Corte longitudinal de ovario aislado a los 3 *dpp* y cultivado 7 días en presencia de PMSG. Se observa una reacción mayor en algunos folículos (flechas). 250X.

LAMINA II



11



12



LÁMINA III

DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LAMININA Y ACTIVIDAD HISTOENZIMÁTICA DE LA $\Delta 5\text{-}3\beta\text{-HSD}$ IN VITRO (*Cortes obtenidos por congelación*)

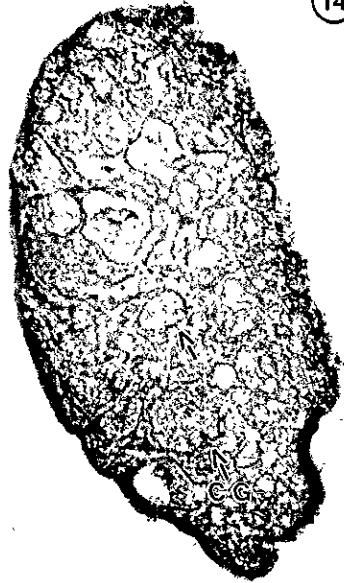
- Fig.13** Corte longitudinal de ovario de ratón de 1 *dpp* y cultivado 9 días en ausencia de PMSG. La reacción de Laminina hace evidente tanto la individualización como el aumento en tamaño de los ovocitos de la región medular (RM). En la región de la corteza (RC) se observan ovocitos aun formando grupos (*). La actividad de la $\Delta 5\text{-}3\beta\text{-HSD}$ no se distingue ya que se encuentra enmascarada por la laminina. 250x.
- Fig.14** Corte longitudinal de ovario de ratón de 1 *dpp* cultivado durante 9 días en presencia de PMSG. Se observan folículos irregulares formados por células foliculares hiperplásicas. Hay una intensa reacción positiva de la $\Delta 5\text{-}3\beta\text{-HSD}$ (flechas), sobre todo en el intersticio de células de la granulosa (CG). 250x.
- Fig.15** Corte longitudinal de ovario de ratón de 3 *dpp*, cultivado durante 7 días en ausencia de PMSG. La reacción de laminina permite detectar las tres etapas de la foliculogénesis. Ovocitos integrados en cordones (etapa I), ovocitos unidos por puentes interfoliculares (flecha) formados por células de la granulosa (etapa II) y ovocitos individualizados (etapa III). La actividad de la $\Delta 5\text{-}3\beta\text{-HSD}$ no es detectable por la presencia de laminina. 250x.
- Fig.16** Corte longitudinal de ovario de ratón de 3 *dpp* y cultivado durante 7 días en presencia de PMSG. La reacción de laminina muestra que la mayoría de los folículos están individualizados. La actividad de la $\Delta 5\text{-}3\beta\text{-HSD}$ permite observar células esteroideogénicas (*) tanto en el intersticio de folículos individualizados (FI), como en células foliculares que forman puentes interfoliculares (flecha).500x.

LAMINA III

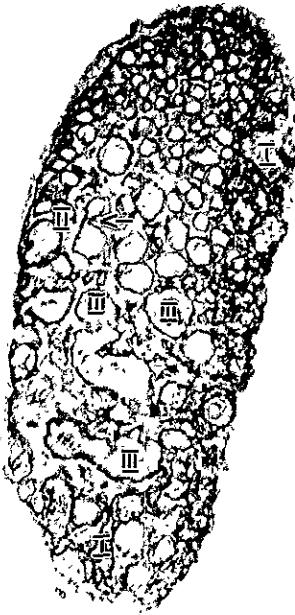
13



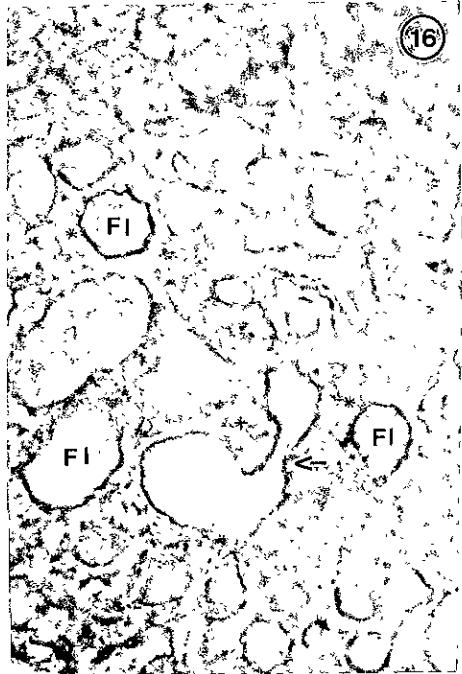
14



15



16



6.4 Determinación cuantitativa de los esteroides intermediarios de las vías $\Delta 5$ y $\Delta 4$.

Con base en las observaciones realizadas con la técnica de la $\Delta 5$ - 3β -HSD, para detectar la presencia de células esteroidogénicas, el siguiente problema por resolver fue identificar qué esteroides se estaban produciendo tanto en los ovarios *in situ*, como en los cultivados con y sin PMSG. Para abordar este problema, se realizó un radioinmunoanálisis (RIA) para determinar los esteroides intermediarios de las vías $\Delta 5$ y $\Delta 4$ [Fig.4].

6.4.1 RIAS de ovarios *in situ*

Para establecer cuantitativamente la producción de esteroides en condiciones de desarrollo normal del ovario, en una primera etapa se analizaron ovarios obtenidos de 1, 3 y 10 *dpp in situ*. Con el método de radioinmunoanálisis se identificaron los principales esteroides correspondientes a la vía $\Delta 5$ (P5, 17α HP5 y DHEA) y $\Delta 4$ (P4, 17α HP4, A, T y E2), así como los niveles obtenidos de cada uno de ellos, expresados en picogramos por mililitros (pgr/ml), [Tabla 1]. Con la gráfica 1 se puede observar con mayor claridad los niveles de esteroides que se están produciendo en ambas vías, desde el primer día posnatal. Dichos niveles se van incrementando con respecto a la edad del ovario, observándose diferencias significativas al comparar los ovarios de la recién nacida con los obtenidos a los 3 y 10 *dpp*. Esto sugiere que el ovario infantil del ratón presenta una gran actividad esteroidogénica desde el primer día del nacimiento; como se corroboró con la técnica de la $\Delta 5$ - 3β -HSD. Por otro lado se encontró que en las tres edades de los ovarios *in situ*, los esteroides que alcanzan los más altos niveles son la P5, DHEA, 17α HP4,T y E2 y la que tiene el más bajo nivel es la 17α HP5.

6.4.2 RIAS de ovarios *in vitro*

A) Ovarios cultivados sin PMSG

Con el fin de establecer la capacidad esteroidogénica de los ovarios mantenidos en cultivo de órganos, se realizaron RIAS de ovarios de 1 y 3 *dpp* cultivados 9 y 7 días respectivamente en ausencia de PMSG. Los análisis muestran que en condiciones *in*

vitro, los órganos pierden entre un 50 y un 70% de su capacidad para producir esteroides, lo cual es evidente al comparar la escala de la gráfica 1 con la de la gráfica 2. Sin embargo, como se puede observar en la tabla 2, los ovarios obtenidos a los 3 *dpp* presentan mayores niveles de esteroides que los ovarios de 1 *dpp*, por lo que se puede decir que el tiempo de cultivo interfiere en la producción de esteroides. Al comparar estos resultados con la reacción de la $\Delta 5-3\beta$ -HSD se puede ver que ocurre lo mismo ya que en el corte del ovario de 1 *dpp* se observa una muy tenue reacción y en el de 3 *dpp* es ligeramente más abundante y dispersa la reacción. Tanto en los ovarios de 1 y 3 *dpp in vitro* comparados con los ovarios de 1 y 3 *dpp in situ* la diferencia no es tan grande, ya que los niveles disminuyen a la mitad aproximadamente en los esteroides 17 α HP5, DHEA y P4, en los esteroides P5, A y T hay una baja del triple y en la 17 α HP4 y el E2 la disminución es mayor. Es claro que transcurrido el tiempo de cultivo los ovarios de las dos edades no alcanzan los niveles de esteroides obtenidos en los ovarios *in situ* de 10 *dpp*, pero las curvas presentan un comportamiento similar. Los esteroides que alcanzan los más altos niveles son la P5, P4, T y E2 y los más bajos niveles corresponden a la 17 α HP5 y 17 α HP4 en mayor cantidad.

B) Ovarios cultivados con PMSG

Tanto en la tabla como en la gráfica3 de ovarios de 1 y 3 *dpp* cultivados 9 y 7 días respectivamente en presencia de PMSG, podemos observar que al añadir la gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG), se incrementan al doble las concentraciones de todos los esteroides analizados de las dos edades, con respecto a los ovarios de 1 y 3 *dpp* cultivados sin PMSG, lo cual es evidente al observar la escala de ambas gráficas. Sin embargo, existen diferencias significativas con los ovarios de 10 *dpp in situ*, puesto que apesar de la estimulación con la hormona éstos no alcanzan los niveles esperados en condiciones de desarrollo normal. Los ovarios de tres días posparto mantenidos 7 días en cultivo, responden más al estímulo de la PMSG, elevando los niveles de un 20% a un 50%; esto también se corroboró con la reacción de la $\Delta 5-3\beta$ -HSD ya que en los cortes de ovario tanto de 1 *dpp* como de 3 *dpp* con PMSG se observa una mayor reacción que en los cortes sin PMSG. Por otro lado observamos que las curvas de ovarios de 1 y 3 *dpp* con y sin PMSG se comportan casi de igual

manera a la curva de 10 *dpp* de ovarios *in situ*, debido a que los ovarios se cultivaron 9 y 7 días, es decir se llevaron a 10 días de cultivo. Los niveles de esteroides que alcanzan los más altos niveles son la P5, P4, A, T y E2 y el más bajo nivel corresponde a la 17 α HP4.

En los tres ensayos la P5 es la que se encuentra en mayor concentración, mientras que el esteroide que es menos abundante es la 17 α HP4 en condiciones *in vitro* con y sin PMSG, pero en condiciones normales es la 17 α HP5.

Tabla 1. Radioinmunoanálisis (RIAS) de ovarios in situ.

| | Ovarios 1 dpp (pgr/ml) | Ovarios 3 dpp (pgr/ml) | Ovarios 10 dpp (pgr/ml) |
|--------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| P5 | 34 | 94 | 122 |
| 17aHP5 | 15,5 | 15 | 25 |
| DHEA | 17,5 | 24 | 75 |
| P4 | 25 | 25 | 31 |
| 17aHP4 | 17 | 37 | 55 |
| A | 25,5 | 40 | 58 |
| T | 27 | 52 | 75 |
| E2 | 34 | 62 | 125 |

Gráfica 1. Niveles de los diferentes esteroides de ovarios in situ

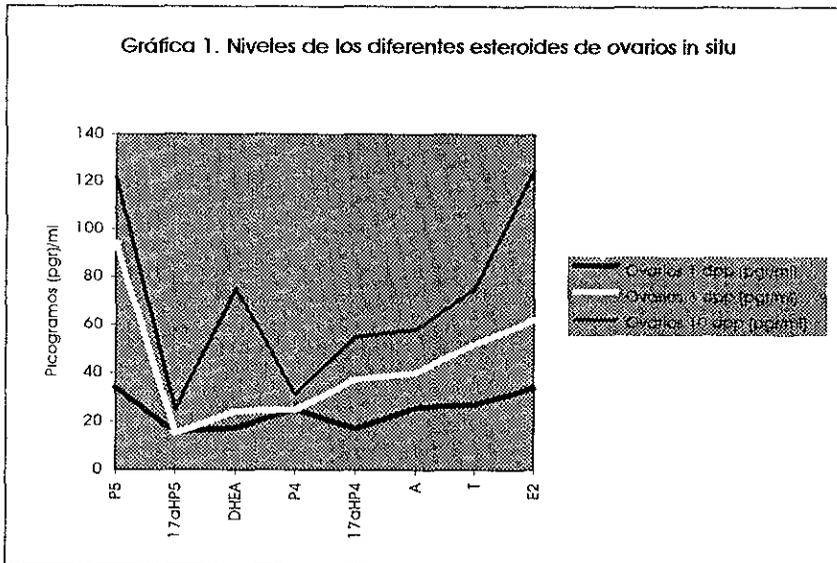


Tabla 2. RIAS de ovarios in vitro cultivados sin PMSG.

| | Ovarios 1 dpp (pgr/ml) | Ovarios 3dpp (pgr/ml) |
|--------|------------------------|-----------------------|
| P5 | 11,9 | 17,4 |
| 17aHP5 | 7,5 | 7,3 |
| DHEA | 6,3 | 8,6 |
| P4 | 10,7 | 11,6 |
| 17aHP4 | 2,4 | 4 |
| A | 6,2 | 10,9 |
| T | 9,5 | 13,5 |
| E2 | 5,9 | 9,7 |

Gráfica 2. Niveles de los principales esteroides de ovarios in vitro cultivados sin PMSG.

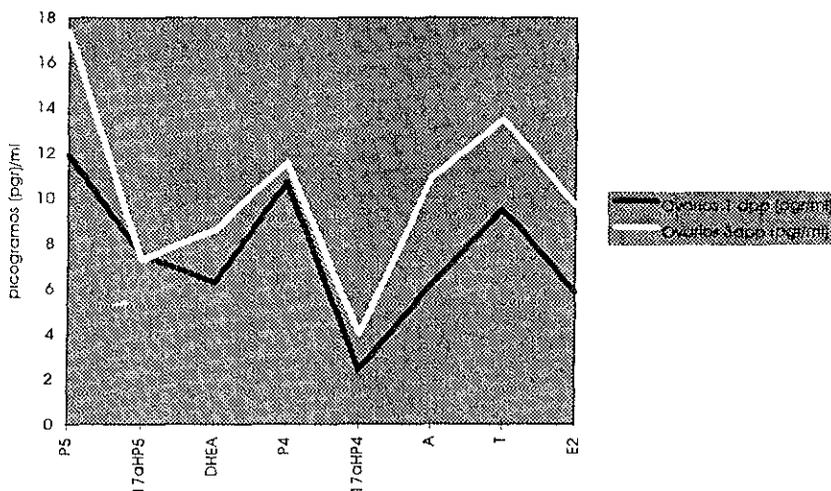
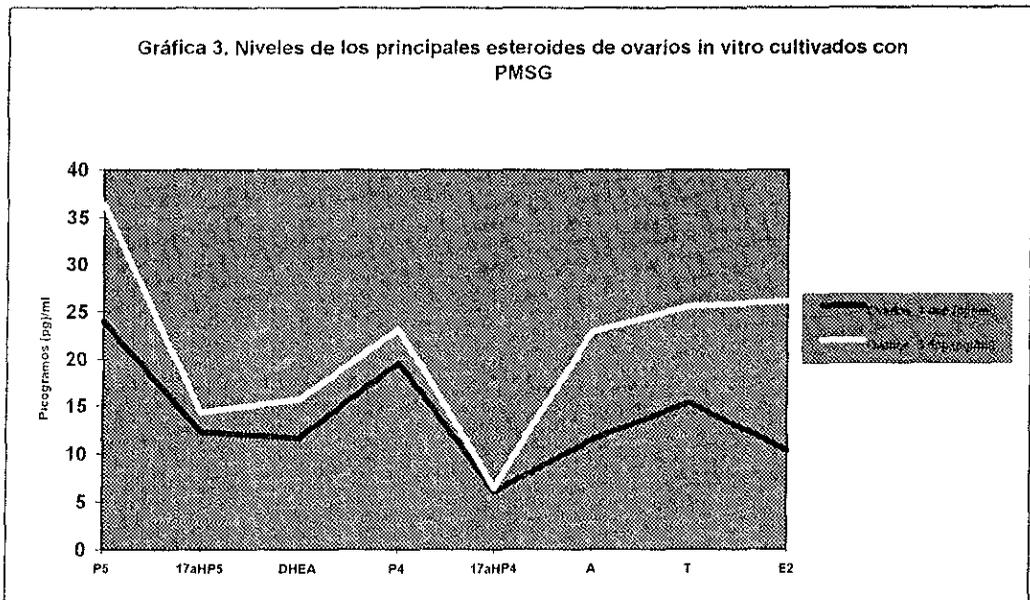


Tabla 3. RIAS de ovarios in vitro cultivados con PMSG

| | Ovarios 1 dpp (pgr/ml) | Ovarios 3 dpp (pgr/ml) |
|--------|------------------------|------------------------|
| P5 | 24 | 36,3 |
| 17aHP5 | 12,3 | 14,3 |
| DHEA | 11,6 | 15,7 |
| P4 | 19,6 | 23,1 |
| 17aHP4 | 6,1 | 6,5 |
| A | 11,5 | 22,9 |
| T | 15,4 | 25,6 |
| E2 | 10,3 | 26,1 |

Gráfica 3. Niveles de los principales esteroides de ovarios in vitro cultivados con PMSG



VII. DISCUSIÓN

La observación directa de las membranas basales de los cordones epiteliales que se puede hacer con la ayuda de la técnica de laminina permitió un seguimiento detallado del proceso de compartimentalización folicular, simultánea a una visión de conjunto de los mecanismos que llevan al desarrollo del ovario como una unidad funcional. Confirmamos así, la existencia de un gradiente de diferenciación folicular, donde la diferenciación de los folículos se inicia en la región medular, continuándose gradualmente hacia la corteza ovárica. La diferenciación de los folículos implica además de su individualización el crecimiento del ovocito, el cambio morfológico de las células foliculares de planas a cúbicas y su activa proliferación para finalmente formar los folículos preantrales. Cuando en el mismo corte combinamos las técnicas de inmunocitoquímica para la laminina y la $\Delta 5-3\beta$ -HSD, pudimos corroborar que la diferenciación del tejido esteroideogénico aparece primero en el intersticio de la región medular.

Los experimentos realizados muestran que el desarrollo del ovario neonatal, su capacidad esteroideogénica y su respuesta a gonadotropinas pueden ser estudiados *in vitro*. Sin embargo, a pesar de que el desarrollo morfológico del ovario se lleva a cabo en condiciones de cultivo, el proceso es más lento. Esto es, el desarrollo folicular de los ovarios de 1 *dpp* cultivados durante 9 días corresponde al observado en ovarios de 5 *dpp*. Este retardo en el desarrollo persiste aún con el tratamiento de gonadotropinas (PMSG).

La influencia de las gonadotropinas en el inicio del crecimiento folicular se ha estudiado en el ovario infantil del ratón *in vivo*, Ratones inyectados diariamente con gonadotropina sérica, no muestran estimulación folicular durante los primeros 12 días (Pfeiffer y Hooker, 1942). La falta de gonadotropinas endógenas, no interfiere con el crecimiento de los ovocitos ni con la organización temprana y la multiplicación de las células de la granulosa (Eshkol *et al*; 1970). Otras evidencias que apoyan que el inicio del crecimiento folicular no es dependiente de gonadotropinas, se basan en experimentos de hemicastración (Peters and Braathen, 1973). En estos experimentos, la

ovariectomía unilateral en ratones de 2 *dpp*, (edad en la cual sólo se pueden observar pequeños folículos) no causa ningún cambio en el número de folículos en crecimiento del ovario no ovariectomizado. Esto sugiere que la hemicastración en el período neonatal no altera el número de folículos que inician el crecimiento en los días subsiguientes.

En el presente estudio, el hecho de que el proceso de compartimentalización de los cordones sexuales ováricos se lleve a cabo en los ovarios mantenidos en cultivo en presencia o ausencia de la gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG), sugiere que el inicio del crecimiento folicular y los mecanismos celulares involucrados en este proceso, son regulados intraováricamente. Por lo tanto, el papel que las gonadotropinas hipofisiarias parecen desempeñar, se refiere a la modulación de la diferenciación de las células esteroideogénicas del compartimento estromático.

Eshkol *et al* (1970), han demostrado la influencia de las gonadotropinas en el desarrollo del ovario del ratón durante los períodos infantil y juvenil. La proliferación y organización de las células foliculares es solamente dependiente de FSH, mientras que la LH inicia el desarrollo del tejido intersticial. La regulación de la proliferación celular y la inducción de la síntesis de esteroides por parte de las gonadotropinas son una consecuencia de los efectos específicos de estas hormonas sobre el metabolismo celular intermediario.

Los folículos ováricos de las hembras de mamíferos producen tres clases de esteroides sexuales: progestinas, andrógenos y estrógenos. Se ha propuesto que la interacción entre las células de la granulosa y las células de la teca regula la producción de las tres clases de esteroides (Hsueh *et al.* 1984). Con base en esta hipótesis, se ha señalado que la LH secretada por la pituitaria, estimula en las células tecales la producción de andrógenos. La FSH estimula en las células de la granulosa folicular la enzima aromatasa que convierten los andrógenos en estrógenos, los cuales son secretados. La FSH también estimula la producción de progesterona en las células de la granulosa, esta última hormona puede ser utilizada por las células de la teca para la síntesis de andrógenos.

Estudios realizados por Kent y Ryle (1975) mostraron que el tejido intersticial sólo puede ser estimulado por LH y hCG, más no por la FSH. Sin embargo, otros autores sugieren que la FSH posee

cierta capacidad para inducir esteroidogénesis, puesto que cuando se suministra su análogo PMSG, la actividad enzimática de la $\Delta 5-3\beta$ -HSD y de la 17β -HSD se incrementa. En el presente trabajo, utilizando un análogo de la FSH, conocida como PMSG se observó que los ovarios aislados y mantenidos en condiciones de cultivo son capaces de responder a la gonadotropina. Realizando la técnica de la $\Delta 5-3\beta$ -HSD se encontró que desde el primer día postnatal (*dpp*), en el ovario de ratón *in situ* existen células esteroidogénicas, las cuales se hallaron en el intersticio de los folículos de mayor tamaño, localizados en la región medular del ovario. Con esta técnica, en la que sólo se puede observar cualitativamente la presencia de células esteroidogénicas, se encontró que los ovarios estimulados con la PMSG presentan un mayor número de células esteroidogénicas, sin alterarse el desarrollo y el número de folículos. Según la edad en la que se inició el cultivo, fue evidente que en los ovarios cultivados a partir del día uno con PMSG, la intensidad de la reacción de la $\Delta 5-3\beta$ -HSD y la cantidad de células esteroidogénicas son mayores que en los ovarios aislados al tercer día postnatal.

La interpretación de estos resultados es difícil. Si se consideran los estudios realizados en ovarios adultos de otras especies, se sabe que los receptores para FSH están presentes en las células foliculares de folículos que apenas tienen una capa de ellas, de manera que su proliferación, y con ello el crecimiento del folículo, dependen de la presencia de gonadotropinas (Richards, *et al.* 1976). Tomando en cuenta estos hechos, se esperaba en los resultados de este trabajo, que los ovarios de 3 *dpp* cultivados durante 7 días en los que la gran mayoría de folículos ya se formaron, respondieran con mayor intensidad a la gonadotropina mientras que los ovarios del ratón recién nacido, no deberían de haber respondido a la hormona ya que sus receptores no existen antes de la formación de los folículos.

Una interpretación de los resultados en relación a los receptores de la gonadotropina es la siguiente: es probable que la presencia de la PMSG en los ovarios de 1 *dpp*, induzca una expresión anormal de sus propios receptores lo que provoca a su vez una hiperplasia de células esteroidogénicas, aunque las condiciones de cultivo favorecen el desarrollo morfológico de los folículos y la diferenciación de células esteroidogénicas similares a

los que ocurren *in situ*. Por otro lado, los ovarios aislados al tercer día postnatal, cuando los folículos ya están individualizados, se comportan como unidades funcionales con una regulación autócrina y parácrina, de manera que la presencia de factores exógenos altera muy poco su patrón normal de desarrollo. Asimismo, no podemos descartar el hecho de que en el medio de cultivo se detectan hormonas, esto puede deberse tanto porque la PMSG se aplica directamente en el medio de cultivo, como porque las hormonas pueden ser secretadas por los propios ovarios. Sin embargo, la concentración de estas hormonas en el medio no es significativa, por lo que no se alteran los resultados antes mencionados, [Com. Per. Merchant-Larios].

Con base en estas observaciones, nos planteamos la interrogante de qué están produciendo estas células esteroidogénicas, tanto en condiciones de desarrollo normal como *in vitro*, estimuladas o no con la PMSG.

En el caso de otras especies como la rata y el conejo, el tejido ovárico se vuelve esteroidogénicamente activo cuando se elevan los niveles de gonadotropinas, iniciándose la producción de esteroides. Sin embargo, los ovarios de estos animales parecen responder a la presencia de gonadotropinas exógenas hasta poco después de la primera semana de vida. (Younglai y Borgmann, 1988; Funkenstein y Nimrod, 1981). Utilizando la técnica de radioinmunoanálisis (RIA), se encontró que en el ratón los ovarios de 1 *dpp in situ* están secretando todos los esteroides intermediarios de las vías $\Delta 5$ y $\Delta 4$, los cuales se incrementan con respecto a la edad del ovario. Además observamos diferencias significativas al comparar los ovarios de la recién nacida, con los obtenidos a los 3 *dpp* y 10 *dpp*. Desde el momento del nacimiento, los ovarios secretan altas cantidades de pregnenolona, progesterona, androsterona, testosterona y estradiol. Esto indica que las enzimas relacionadas con la biosíntesis de esteroides están presentes desde etapas tempranas del desarrollo folicular.

En condiciones *in vitro*, sin embargo, los ovarios parecen perder su capacidad esteroidogénica conforme avanza el tiempo de cultivo. Cuando los ovarios son estimulados con PMSG, se restaura la actividad esteroidogénica, observándose un incremento de un 20% a un 50%, pero nunca se logran los niveles alcanzados en condiciones de desarrollo normal. Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas por Farkash *et al.* (1986). Ellos

encontraron que el número de células tecales donde se localizan enzimas mitocondriales involucradas en la síntesis de esteroides, se incrementa después del tratamiento con la PMSG. De tal manera que es claro que la presencia de gonadotropinas es necesaria ya sea para inducir o para mantener la diferenciación de las células esteroideogénicas y con ello la producción de enzimas relacionadas con este proceso.

Cuando comparamos el desarrollo del ovario *in situ* durante los primeros diez días después del parto, con los ovarios mantenidos en cultivo de órganos durante el mismo tiempo, la similitud nos permite una importante deducción: el proceso de compartimentación de los folículos (Foliculogénesis), como la diferenciación inicial del tejido intersticial esteroideogénico son procesos que dependen de un control intraovárico. Por lo tanto, la regulación neural, neuroendócrina y endócrina del proceso de foliculogénesis, atresia, luteinización, etc. se establecerán después de los diez días aquí estudiados.

VIII. CONCLUSIONES

En el caso del ratón,

- 1) Las gonadotropinas hipofisarias no participan en el proceso de la foliculogénesis en las etapas tempranas del desarrollo del ovario.
- 2) El papel que las gonadotropinas parecen desempeñar, se refiere a la modulación de la diferenciación de las células esteroidogénicas del estroma.
- 3) Los ovarios del ratón recién nacido tienen la capacidad de secretar todos los esteroides intermediarios de las vías $\Delta 5$ y $\Delta 4$, lo que indica que las enzimas relacionadas con la biosíntesis de esteroides están presentes en el inicio del proceso de foliculogénesis.
- 4) Conforme avanza el proceso de foliculogénesis, los ovarios parecen comportarse como unidades funcionales, por lo que las gonadotropinas exógenas alteran muy poco su patrón normal de desarrollo.

- Byscov, A. G; Skakkebaek, N. E; Stafanger, G; Peters, H. (1977). "Influence of ovarian surface epithelium and rete ovarii on follicle formation". *J Anat*, 123:77-86.
- Byscov, A. G. (1978). "The meiosis inducing interaction between germ cells and rete cells in the fetal mouse gonad". *Ann Biol. Anim. Biochem. Biophys*, 18:327-334.
- Byscov, A. G. (1979). "Regulation of meiosis in mammals". *Ann Biol. Anim. Biochem. Biophys*, 19:1251-1261.
- Byscov, A. G. (1981). "Gonadal sex and germ cell differentiation. En: Mechanisms of sex on differentiation in animals and man". (eds. Austin CR y Edwards RG). *Academic Press London*, 145-164.
- Collenot, G. y Collenot, A. (1977). "L'activité, 3 β -hydroxysteroid dèshydrogénasique dans les gonades en différenciation de Pleurodeles Waltlii (Amphibien, Urodele); visualisation sur coupes sèriées a l'une nouvelle technique histochimique". *J. Embryol Exp. Morph*, 42:29-42.
- Chimal, J. M. (1987). "El proceso de foliculogenesis en el ovario de ratón (*mus musculus*): Estudio experimental *in vitro*". Tesis profesional. Fac. de Ciencias. Depto de Biología, UNAM.
- Chiquione, A. D. (1954). "The identification, origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo". *Anat Rec*, 118:135-146.
- Chowdhury, M. y Steinberger, E. (1976). "Pituitary and plasma levels of gonadotrophins in fetal and new-born male and female rats". *J. Endocrinol*, 69:381-384.
- Crumevolle-Arias, M. y Aschheim, P. (1976). "Sècrètion d'oestrogène ovarien induite par HCG chez la ratte impubère hypophysectomisès" *C. R. Acad Sc Paris*, 282(24): D-2207-2210.
- Döhler, K. D. & Wutke, W. (1974). "Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepubertal male and female rats". *Endocrinology*, 97:898-907.
- Everett, A. D. (1945). "The present status of the germ cells problem in vertebrates". *Biol Rev*, 20:45-55.

Eshkol, A; Lunenfeld, B. and Peters, H. (1970). " Ovarian development in infantile mice. dependence on gonadotropic hormones". *In: Gonadotrophins and development.* 249-258.

Farkash, Y; Timberg, R. and Orly, J. (1986). "Preparation of antiserum to rat cytochrom P-450 Cholesterol side chain cleavage, and its use for ultrastructural localization of the immunoreactive enzyme by protein A-gold technique". *Endocrinology.* 118:1353-1365.

Funkenstein, B; Nimrod, A. and Linder, H. R. (1980). "The development of steroidogenic capability and responsiveness to gonadotropins in cultured neonatal rat ovaries". *Endocrinology,* 106:98-106.

Funkenstein, B. Nimrod, A. (1981). "Control of developmental processes in cultured neonatal ovaries. En: Development and function of reproductive organs. (A. G. Byscov, and H. Peters, eds). *Excerpta Medica,* 307-318.

Garza, F; and Terranova, P. F. (1984). "Inhibition of thecal androstenedione production by exogenous progesterone in the cyclic hamster". *J. Reprod. Fertil;* 70:493-498.

Gillman, J. (1948). "The development of gonads in man, with a consideration of the role of fetal endocrines and histogenesis of ovarian tumors". *Contrib. Embriol. Carnegie Inst. Washinton,* 32:81-83.

Goldman, A. S y Kohn. (1970). "Rat ovarian 3 β - hydroxysteroid dehydrogenase. Normal development appearance in tissue culture.*Proc. Soc. Wxp. Biol. Med.* 133:475-418.

Goldman, A. S; Baker M.K. y Stanek A. E. (1972) "Development of Δ^5 -3 β hydroxysteroid and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the testes, adrenals and ovaries of the rabbit fetus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140:1486-1492.

Gondos, B. (1984). "Germ cell differentiation and intercellular bridges". En: *Ultrastructure of reproduction.* (Eds. Van Berkmon J y Motta PM). Martinus Nijhoff Publishers, Boston. 31-45.

Gore-Langton, R.E. and Armstrong, D.T. (1988). "Follicular Steroidogenesis and its Control". *The physiology of reproduction*, edited by E. Knobil and J. Neil *et al.* Raven Press. Ltd; New York; 10:331-385.

Grop, A. y Ohno, S. (1966). "The presence of a common embryonic blastema for ovarian and testicular parenchymal (follicular, interstitial and tubular) cell in cattle. *Bos taurus* " *Zellforsch.* 74:505-578.

Gruenwald, P. (1942). "the development of the sex cords in the gonads of man and mammals". *Am J Anat.* 70:359-397.

Guraya, S.S; and Greenwald, G.S. (1968). "A comparative histochemical study of interstitial tissue and follicular atresia in the mammalian ovary". *Anat. Rec.* 149:411-434.

Guraya, S.S. (1973). "Interstitial gland tissue of mammalian ovary". *Acta endocrinol* (kbh). 171:5- 27.

Guraya, S. S. (1975). "Histochemical observations on the lipid changes in the ovarian interstitial gland tissue of rats". *J. Reprod. Fertil* 45(1):141-145.

Hawkins, J. R; Koopman, P. and P. Berta. (1991). "Testis determining factor and Y-linked sex reversal". *Current Opinion in genetics and development.* 1:30-33.

Hillscher, B. y Hillscher, W. (1978). "Some details on the kinetics of oogonia and M-prospermatogonia in NMRI mice in comparison to rat and man. En: Development and function of reproductive organs". (Edsd. Byscov AG y Peters H). *Experta Medica.* Amsterdam. 131-139.

Hoyer, P. E; and Byscov, A. G. (1981). "A quantitative cytochemical study of $\Delta 5-3\beta$ - hydroxysteroid dehydrogenase activity in the rete system of the immature mouse ovary". In: Development and function of reproductive organs, edited by A. G. Byscov and H. Peters. *Excerpta Medica, Amsterdam.* 216-224.

Ireland, J. y Richards, J. (1978). "A previously undescribed role for luteinizing hormone (LH:hCG) on follicular cell differentiation". *Endocrinology.* 102:1458-1465.

- Itsuch, A. J. W;** Adashi, E. Y; Jones, P. B. C. and Welsh, T. H. Jr. (1984). "Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrine Reviews* 5. 76-127.
- Josso, N. y Picard, J. Y.** (1986). "Anti-Mullerian hormone". *Physiol Rev.* 66:1038-1090.
- Karnovsky, M. J.** (1965). "A formaldehyde-Glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy". *J Cell Biol.* 27:137 A.
- Kent, J. y Ryle, M.** (1975). "Histochemical studies on three gonadotropin responsive enzymes in the infant mouse ovary". *J. Reprod. Fertil.* 42(3):519-536.
- Koopman, P;** Andrea, Munsterberg; Blanche, Capel; Nigel, Vivian and Robin, Lovell-Badge. (1990), "Expression of a candidate sexdetermining gene during mouse testis differentiaton". *Nature.* 348:450-452.
- Koopman, P;** Gubbay, J; Vivian, N; Goodfellow, P; Lovell-Badge, R. (1991)."Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry". *Nature.* 351:117-121.
- Levy, H;** Deane, H. W; Rubin, B. L. (1959). "Visualization of steroid-3-ol-Deshydrogenase activity in tissues of intac and hypophysectomized rats". *Endocrinology.* 65:932-943.
- Luft, J. H.** (1961). "Improvements in epoxy resins embedding methods. *J. Biophys Biochem Cytol.* 9:409-416.
- Magre, S;** Angelopoulou, A. and Jost, A. (1980). "Cellules de sertoli en organogènese du testicule foetal" *Endocrinology (Paris).* 41:531-537.
- Mandel, J.** (1935). "An experimental study of ovarian irradiation organogenesis in the rat; An electron microscopy study". *Arch Anat Microsc Morphol Exp.* 69:297-318.
- Mendieta, E;** Salame, A; Herrera, J. and Antón-Tay, F. (1991). "Melatonin inhibition of androgen biosynthetic pathway in Leydig cell-enriched cell fractions from normal adult rat". *Mol. Androl;* 3:319-329.

- Merchant, L. H. and L. Zamboni. (1972). "Presence of connections between follicles in juvenile mouse ovaries". *Am. J. anat.* 134:127-132.
- Merchant, L. H. (1975). "Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells". An ultrastructural study. *Develop Biol.* 41:1-21.
- Merchant-Larios, H. (1975a). "The role of germ cells in the morphogenesis and cytodifferentiation of the rat ovary". *Progress Differentiation Research.* (Eds. N. Muller-Berat *et al*). 453-462.
- Merchant-Larios, H. (1976). "The role of germ cell in the morphogenesis and cytodifferentiation of the rat ovary" *En: Elsevier New York.* 453-462.
- Merchant-Larios, H. (1978). "Ovarian differentiation". *In: The vertebrate ovary.* R. E. Jones, ed. New York, Plenum Press. 47-81.
- Merchant-Larios, H. and Centeno, B. (1981). "Morphogenesis of the ovary from the sterile W/W^v mouse. In vitro". E, Galina M, (eds): *Advances in the morphology of cells and tissues.* New York: Alan R Liss. 383-392.
- Merchant-Larios, H. (1984). "Germ and somatic cells interactions during gonadal morphogenesis". *En: Ultrastructure of Reproduction* (Eds. Blerkom J Motta PM) Martinus Nijhoff Publishers Boston. 1930.
- Merchant-Larios, H. y Chimal-Monroy. (1989). "The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary". *In: Development in Ultrastructure of reproduction.* (Motta, P. Ed.) Alan R Liss, Inc. New York. 55-63.
- Merchant-Larios, H; and Taketo, T. (1991). "Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions". *J electron Microscop Tech.* 19:158-171.
- Merchant-Larios, H; Moreno-Mendoza, N. y M. Buehr. (1993). "The role of the mesonephros in the cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis". *J. Dev. Biol.* 37:407-415.
- Moor, R. M. (1973). "Oestrogen production by individual follicles explanted from ovaries of sheep". *J. Reprod Fert.* 32:545-548.

Odor, L. D. y Blandau, J. R. (1971). "Organ cultures of fetal mouse ovaries"; Light microscopic structure. *Am J Anat.* 131:387-414.

Ohno, S. y Smith, J. B. (1964). "Role of fetal follicular cells in meiosis of mammalian oocytes". *Cytogenet.* 3:324-333.

Ohno, S; Nagai, Y. y Ciccicarese, S. (1979). "Testis-organizing H-Y antigen and the primary sex determinating mechanism of mammals". *Recen Prog Horm Res.* 35:449-478.

Paranko, J. (1987). "Expression of type I y II collagen during morphogenesis of fetal rat testis and ovary". *The anatomical Record.* 219:91-101.

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

Pelloux, M. C; Picon R; Gangnerau M. N. y Darmoul, D. (1988). "Effects of busulfan on ovarian folliculogenesis, steroidogenesis and anti-Mullerian activity of rat neonatales. *Acta Endocrinol.* 118(2):218-226.

Peters, H. and Braathen, B. (1973). "The effects of unilateral ovariectomy in the neonatal mouse on follicular development. *J. Endocr.* 56-85.

Pfeiffer, C. A. and Hooker, C. W. (1942). "Early and late effects of dally treatment with pregnant mare serum upon the ovary of mice of the Astrain. *Anat. Rec.* 84:311.

Pheleman, F. W. y Lombard, M. N. (1978). "Differentiaton of ovarian and testicular interstitial cells during embryonic and post embryonic development in mice". *Cell Tissue Res.* 188:465-480.

Picon, R. (1985). "Stades initiaux de la esteroidogenese dans les gonades de mammiferes. *Arch anat Micros Morph Exp.* 74(1):81-86.

Quatropani, S. L. (1973). "Morphogenesis of the ovarian interstitial tissue in the neonatal mouse". *Anat. Rec.* 177:569-584.

Rennels, E. G. (1951). "Influence of hormones on the histochemistry of ovarian interstitial tissue in the immature rat". *Amer. J. Anat.* 88:63-100.

Richards, J. S; Ireland, J. J; Rao, M.C; Bernath, G. A; Midgley, A.R; Reichert, L.E. (1976). "Ovarian follicular development in the rat: Hormone receptor regulation by estradiol, follicle stimulating hormone luteinizing hormone". *Endocrinology.* 99:1562-1570.

Schlegel, R. J; Farias, E; Russo, N. C; Moore, J. R; and Gardner, L. I. (1967). "Structural changes in the fetal gonads and gonaducts during maturation of an enzyme, steroid 3 α -ol-dehydrogenase, in the gonads, adrenal cortex and placenta of fetal rats". *Endocrinology.* 81:565-572.

Silver, W. K. y Wachtel, S. S. (1977). "H-Y antigen: Behaviour and function. A cell surface component of vertebrate may be directly involved in primary sex determination". *Science.* 195:956-960.

Stein, L. E. and E. Anderson. (1981). "In vitro analysis of ovarian differentiation and the initiation of meiosis in the rat". *Acta Anat.* 110:189-205.

Susuki, K; Kawakura, K. and Tamaoki, B. I. (1978). "Effect of pregnant mare's serum gonadotrophins on the activities of 5 α -reductase, aromatase, and other enzymes in the ovaries of immature rats". *Endocrinology.* 102:1595-1605.

Tuckey, R. C; Lee, G; Costa N. D. y Stevenson P. M. (1984). "The composition and distribution of granules in the rat ovary". *Mol Cell Endocrinol.* 38(2-3):187-195.

Upadhyay, S. y Zamboni, L. (1982). "Ectopic germ cell: Natural model for the study of germ cell sexual differentiation". *Proc Natl Acad Sci USA.* 79: 6584-6588.

Wachtel, S. S; Ohno, S; Koo, G. C; y Boyse, E. A. (1975). "H-Y antigen and male development". En: *The testis in normal and infertile men.* (Ed. Troen P Y Nankin R H). 35-43.

Wartenberg, H; Inge, Kinsky; Christiph; Viebahn and Cordula; Schmolke. (1991). "Fine structural characteristics of testicular cord formation in the developing rabbit gonad". *J of Electron Microscopy Technique.* 19:133-157.

Weiss, P. (1945). "Experiments on cell and axonal orientation in vitro: The role of extracellular exudates in tissue organization. *J. Exp. Zool.* 100:353-386.

Weisz, J; Gunsalus, P. (1973). "Estrogen levels in immature female rats: true or spurious- ovarian or adrenal?". *Endocrinology.* 93:1057-1065.

Witschi, E. (1948). "Migration of the germ cell of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal". *Contrib embryol.* 32:67-80.

Witschi, E. (1951). "Embryogenesis of the adrenal and reproductive glands". *Recent Prog Horm Res.* 6:1-23.

Younglai, E. y Borgmann, A. (1988). " Changes in 3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase activity in the developing rabbit ovary". *J. Steroid Biochem.* 31(6):938-986.

Zamboni, L. (1972). "Comparative studies on ultrastructure of mammalian oocytes". En: Oogenesis. (Eds. Biggers JD y Schuetz AW). *University Park Press, Baltimore.* 5-45.

Zetterqvist, H. (1956). "The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum". *Ph. D. Thesis.* *Karolinska Institute, Stockholm.*