



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE HORMONAS  
ESTEROIDES POR LAS GONADOTROPINAS EN EL  
OVARIO DE LAS AVES**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)**

**P R E S E N T A**

**YOLANDA DE LAS MERCEDES GÓMEZ Y GÓMEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. ENRIQUE PEDERNEA ASTEGIANO**

**MÉXICO D.F.**

**AGOSTO 2011**



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.

## I N D I C E

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
Diferenciación y morfogénesis gonadal	
Mamíferos	7
Aves	15
Biosíntesis de las hormonas esteroides	21
Receptores nucleares	29
Mecanismo de acción de las Gonadotropinas	34
Esteroidogénesis durante el desarrollo del ovario en aves	39
PLANTEAMIENTO DEL PLOBLEMA	43
OBJETIVOS	44
MATERIAL Y METODOS	45
RESULTADOS	51
DISCUSION	64
CONCLUSIONES	72
REFERENCIAS	74

## AGRADECIMIENTOS

A los miembros que formaron parte de mi jurado:

Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin

Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza

Dr. Pedro Nicolás Velázquez

Dra. Marta Alicia Menjivar Iraheta

Dra. Veronica Díaz Hernández

Por la revisión de manuscrito y las útiles aportaciones que permitieron mejorar este trabajo.

Al Dr. Enrique Pedernera Astegiano, por su confianza, por darme la oportunidad de conocer esta área de investigación, por todo el apoyo que me dio, por todo lo que me enseñó como profesor y ser humano, por su asesoría y orientación en este documento.

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

A4	Androstenediona
AMPC:	Adenosina 3', 5' monofosfato
ATP:	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
Cpm:	Cuentas por minuto
DMEM	Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DHEA	Dehidroepiandrosterona
E1	estrona
E2	estradiol
FSH	Hormona Folículo Estimulante
FSHR	Receptor de la Hormona Folículo Estimulante
hCG	Gonadotropina coriónica humana
LH	Hormona Luteinizante
LHR	Receptor de la Hormona Luteinizante
MIX	1-metil 3-isobutil xantina
P450scc	Complejo enzimático de escisión de la cadena lateral del colesterol
P450arom	Citocromo P450aromatasa
P4	Progesterona
P5	Pregnenolona
Rf	Factor de retención
RIA	Radioinmunoanálisis
rpm	Revoluciones por minuto
SF-1	Factor esteroideogénico-1
TLC	Cromatografía en capa fina
T	Testosterona
$\Delta 4$	5 $\beta$ -androstenediona
5 $\beta$ diona	Androstenediol
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
17 $\beta$ -HSD	17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
17OHP4	17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona
17OHP5	17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona

## **R E S U M E N**

La hormona Foliculo Estimulante (FSH) juega un papel crítico en el desarrollo de las gonadas. La FSH estimula la proliferación celular, el crecimiento, la síntesis de DNA y la secreción de esteroides en el ovario (Velazquez et al. 1997; Pedernera et al 1999; Liu et al. 2010). Sin embargo la función de las gonadotropinas (FSH y LH) en los pasos de la vía esteroidogénica no ha sido estudiada.

En el presente trabajo se utilizaron células del ovario de embriones de 10 y 18 días. Las células disgregadas fueron sembradas en una membrana de policarbonato durante 60hr en DMEN con 0.5UI/mL con FSH y LH. Transcurido el tiempo las células fueron recuperadas e incubadas con diferentes hormonas tritiadas.

La producción de estrona (E1) a partir de androstenediona (A4) fue incrementada en las células tratadas con FSH y rhFSH indicando un efecto estimulador en la enzima aromatasa (P450arom). Este incremento es observado en las células del ovario de 10 y 18 días. La transformación de dehidroepiandrosterona (DHEA) a androsterona (A4) es realizada por la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD). Esta enzima fue estimulada en las células del ovario de 18 días con FSH y rhFSH.

La producción de pregnenolona (P5) en la fracción mitocondrial de las células del ovario de embriones de 18 días fue incrementada con FSH y hrFSH.

## I N T R O D U C C I Ó N

El ovario tiene dos funciones; la formación de los gametos y la producción de hormonas sexuales. Los folículos son las principales unidades funcionales que secretan las hormonas esteroides, estas hormonas juegan un papel importante en la diferenciación y maduración de los gametos, en el desarrollo del aparato reproductor y la aparición de los caracteres sexuales secundarios.

La adenohipófisis secreta las gonadotropinas: Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH). La FSH tiene su acción en las células de la granulosa del folículo del ovario, estimulando la expresión de P450arom para la síntesis de  $17\beta$ -estradiol. En tanto que la LH actúa sobre las células de la teca interna para la producción de andrógenos (Knight y Glister 2006; Richards y Pangas 2010).

Las hormonas esteroides, son moléculas que se biosintetizan en los órganos endocrinos como son el ovario, testículo y la glándula suprarrenal, las cuales vierten su secreción hacia los líquidos corporales, ejerciendo un efecto específico sobre las células del órgano blanco.

Estas hormonas esteroides también pueden actuar localmente en el mismo folículo que los sintetiza como moduladores parácrinos o como moduladores autócrinos dentro de las células que los producen (Richards y Pangas 2010).

## DIFERENCIACION Y MORFOGENESIS GÓNADAL

### \* MAMIFEROS

La diferenciación del primordio gonadal es un proceso continuo y ordenado que involucra la expresión de genes en cascada.

Este proceso tiene características comunes en reptiles, aves y mamíferos (Morrish y Sinclair 2002). En mamíferos el sexo genético es establecido en el momento de la fecundación por el espermatozoide que contiene el cromosoma Y o el cromosoma X.

El genotipo femenino tiene 46 cromosomas XX (sexo homogamético), mientras que el masculino tiene un arreglo cromosómico 46 XY (sexo heterogamético). La determinación morfológica del testículo comienza con la expresión del gen **SRY** denominado "región determinante sexual del cromosoma Y", localizado en el brazo corto del cromosoma Y (Koopman et al. 1991; Tilmann y Capel 2006), éste gen desencadena una serie de eventos para la determinación del testículo humano y en el ratón su homólogo Sry. El gen SRY está constituido por un solo exon que codifica para una proteína de 204 aminoácidos con una región central HMG (High Mobility Group) la cual está altamente conservada durante la filogenia de los vertebrados (Morrish y Sinclair 2002; DeFalco y Capel 2009). Esta proteína tiene la capacidad de unirse al ADN y está emparentada con otras moléculas que actúan como reguladores transcripcionales. Se piensa que esta proteína es el elemento regulador de otros genes cuya expresión determina la morfogénesis testicular. Entre los genes que pudieran estar regulados por esta proteína está el gen SF-1 (factor esteroideogénico-1), que controla la activación de enzimas esteroideogénicas (Sekido y Lovell-Badge 2008).

El gen SRY actúa como una señal que activa a otros genes necesarios para dirigir la determinación del testículo



desencadenando la vía de expresión de diversos genes involucrados en el proceso de determinación sexual, por ello es considerado el factor determinante del testículo (FDT/Fdt) (Díaz-Hernández y Merchan-Larios 2009). Los genes involucrados en la determinación del sexo en mamíferos son SOX9, AMH, WT1, SF-1, DAX1 y DMRT1 (Morrish y Sinclair 2002; Kanai et al. 2005; Wilhelm et al. 2009; DeFalco y Capel 2009; Sekido 2010).

El gen SRY/Sry es necesario pero no es el único para el determinación del testículo de mamíferos. Estudios hechos en ratón mostraron que el gen Sry de algunas líneas de ratón falló en la diferenciación del testículo cuando este gen es colocado en otra línea de ratón. Esto nos indica que hay otros factores que intervienen en la diferenciación del testículo (Gilbert, 2003; Kanai et al. 2005).

El factor determinante del testículo regula la expresión de genes autosómicos que están involucrados en la diferenciación testicular, como el gen SOX9, este gen se expresa en ambos sexos en un principio, pero a partir de la expresión de SRY se expresa en el núcleo de las futuras células de Sertoli. Después del nacimiento SOX9/Sox9 solo se expresa en las células de Sertoli, y no se detecta en el ovario (Morrish y Sinclair 2002; Kobayashi et al. 2005; DeFalco y Capel 2009).

SOX9 es un miembro de la familia de los genes del desarrollo que están relacionados en virtud de compartir más del 50% de los aminoácidos, SOX9 codifica para una proteína con un dominio HMG semejante en secuencia al SRY. SOX9 en ratones y en humanos tiene dos dominios de activación de la transcripción, que indican que es un típico factor de transcripción (Morrish y Sinclair 2002; Sekido 2010).

**SOX9:** un gen determinante testicular autosómico

SOX9 es un gen autosómico que se encuentra en todos los vertebrados, este gen se expresa inmediatamente después de la expresión de Sry en las células indiferenciadas de Sertoli, y activa la expresión de varios genes, como Amh (hormona Anti-Mulleriana), Vnn-1 (vanin-1) y Pgds (postaglandina-D-sintetasa) que intervienen en la diferenciación del testículo. La (AMH) es la primera proteína secretada por las células indiferenciadas de Sertoli y es estimulada por SOX9. Así Sry, Amh y Sox9 son componentes en la determinación y diferenciación del testículo. Sry y Sox9 son necesarios para inducir el desarrollo testicular (Wilhelm et al. 2009).

#### **DAX1**

El gen DAX1 se localiza en el cromosoma X y se expresa durante la determinación de ambas gónadas y de las glándulas suprarrenales, pero su expresión es mas alta en el ovario que en el testículo y disminuye en la diferenciación del testículo, esto sugiere que DAX1 opera en la determinación de la formación del ovario (Swain et al. 1999; Kousta et al. 2010).

DAX-1 es un miembro de los receptores nucleares conocidos como receptores huérfanos, se expresa en células somáticas de la gónada bipotencial de ambos sexos. Después de la determinación sexual, DAX-1 es expresado en células de Sertoli, Leydig y en el ovario en células de la teca y granulosa durante el desarrollo embrionario y la edad adulta. Se propone que DAX-1 es un gen represor de la transcripción de SRY en machos, ambos genes se expresan en ambos tejidos y al mismo tiempo (Morrish y Sinclair 2002).

Estudios con técnicas inmunohistoquímicas mostraron que la proteína DAX-1 se expresa durante la embriogénesis de la gónada masculina y femenina de varias especies, cerdo, pollo, caimán y ranas (Lalli y Sassone-Corsi 2003).

#### **WNT4**

WNT4 es un gen autosómico que se expresa en la cresta urogenital del ratón, mientras es una gónada bipotencial, y es indetectable cuando se diferencia en testículo, pero en la gónada femenina XX se mantiene (Gilbert 2005; Capel 2009).

#### **SF-1; factor esteroideogénico-1**

El factor esteroideogénico-1 (SF-1) es un miembro de la superfamilia de receptores intracelulares que juegan un papel esencial en el desarrollo y función de varios órganos endocrinos, SF-1 se expresa en los tejidos esteroideogénicos en formación, los cuales son regulados por los citocromos P450 de las hormonas esteroideas (Ikeda et al. 1997; Parker et al. 2001; Oreal et al. 2002; Mlynarczuk y Rekawiecki 2010).

SF-1 ha sido localizado con técnicas inmunohistoquímicas e hibridación *in situ* durante el desarrollo de las gónadas y de la glándula suprarrenal (fetos de ratón de 10.5 días). En el testículo SF-1 se expresa en las células de Sertoli y Leydig y células de la granulosa del ovario (Ikeda et al., 1994; Schmahl et al. 2000; Jeyasuria et al. 2004).

En el ratón, Sf-1 y Amh (hormona antimulleriana) se expresan parcialmente en las células de Leydig durante el desarrollo del testículo. Se ha sugerido que Sf-1 puede regular Amh, *in vitro* Sf-1 ha mostrado unión al promotor de Amh (Shen et al. 1994). Esto sugiere que Sf-1 puede jugar varios roles en la

diferenciación de la gónada. Inicialmente Sf-1 es necesario para el mantenimiento de la bipotencialidad de la cresta urogenital, después juega un papel en la regulación de Amh en el testículo en el desarrollo del ovario, glándulas suprarrenales y durante la esteroidogénesis.

Jeyasuria y col. en 2004 observaron que la falta total de Sf-1, en los animales, viven poco tiempo después del nacimiento, por los bajos niveles de andrógenos y corticosteroides suprarrenales. Este factor Sf-1 es indispensable para la organogénesis e inicio de la síntesis de esteroides en tejidos esteroidogénicos (Ikeda, 1996; Parker y Schimmer 2001, 2002; Lin Achermann 2008).

SF-1 regula todos los genes involucrados en la esteroidogénesis y el transporte del colesterol requerido para la esteroidogénesis. Es una proteína de 53 KDa llamada Ad4BP (Adrenal 4 Binding Protein) o SF-1 (Steroidogenic Factor-1) (Val et al. 2003; Zubair 2009).

### **WT-1**

El gen del tumor Wilms-1 (WT-1) es un oncogen asociado con el cáncer del riñón en niños. Este gen se expresa en la cresta urogenital del ratón de 9 días de machos y hembras. Los pacientes con el síndrome Denys-Drash tienen mutaciones heterocigotas en WT-1 presentando anomalías en el riñón, gónadas y genitales (Sinclair 1998).

En ratones que carecen de ambas copias de Wt-1 no desarrollan gónadas ni glándulas suprarrenales, lo que sugiere que su función temprana es necesaria en la formación de estos órganos. WT-1 es un gen requerido en mamíferos para establecer la gónada bipotencial y juega un papel en el desarrollo del testículo (Morrish y Sinclair 2002).

### **Diferenciación morfológica de la gónada**

La diferenciación de la gónada en ovario o testículo es lo que se conoce como sexo gonadal.

Las gónadas secretan hormonas esteroides que son esenciales para el desarrollo de los genitales internos, externos y de los caracteres sexuales secundarios, lo que constituye el sexo fenotípico.

La primera manifestación de las gónadas se aprecia en forma de un par de eminencias longitudinales de epitelio mesodérmico que va engrosarse para formar la cresta genital, localizada en el área ventral del mesonefros en desarrollo. Desde el punto de vista embriológico la gónada se forma por dos tipos de células; las células somáticas de origen mesodérmico y las células primordiales germinales (CGPs) de origen epiblasto en aves y en algunos mamíferos (Buehr 2003; DeFalco y Capel 2009).

La proliferación de las células germinales y somáticas es lo que lleva a la formación de los primordios gónadales, que es idéntico en ambos sexos. De esta manera queda establecida la gónada morfológicamente indiferenciada, constituida por células somáticas y CGPs.

Allegrucci y col. 2005 reportan que las CGP en la especie humana se forman del epiblasto durante la segunda semana de desarrollo. En la cuarta semana empiezan a emigrar del saco vitelino a las futuras gónadas. Estas células CGP, están en los pliegues genitales a la sexta semana de desarrollo embrionario en el humano.

Las células precursoras de las CGPs expresan *fragilis*, un gen que codifica para una proteína transmembranal. Sin embargo esta expresión de *fragilis* en las células puede formar tanto

CGPs como células somáticas. Dentro de estas células hay un pequeño grupo de células que expresan la Stella, las cuales están restringidas al destino de células germinales (Gilbert 2005).

Las CGPs se reconoce tempranamente en la ontogénesis, entre las células endodérmicas de la pared del saco vitelino cerca de la alantoides, las podemos reconocer porque son más grandes que las células somáticas, tienen citoplasma claro, núcleo grande vesiculoso y redondo con nucléolos prominentes. Estas células sexuales primitivas se identifican con mayor precisión por medio de técnicas histoquímicas, ya que contienen enzimas específicas y sustancias químicas, como la fosfatasa alcalina (mamíferos), estérasas, abundante glúcogeno (aves) (Byskov 1986; Buehr 2003) y expresan el gen VASA (mamíferos y aves) (Castrillon et al 2009; Nakamura et al. 2007; Gustafson y Wessel 2010).

Las células germinales aparecen en el ratón en el sexto día de desarrollo, en el pollo se pueden distinguir antes de la gastrulación y en el humano por el día 22 de vida embrionaria, en el endodermo de la alantoides: en todos los casos estas células migran hacia el primordio de la gónada. Alrededor de la cuarta semana de vida intrauterina en los embriones humanos, las CGP inician su migración desde el endodermo del intestino y el epitelio dorsal del saco vitelino a través del mesodermo dorsal para arribar a la quinta semana al primordio gonadal.

El proceso migratorio se realiza por dos tipos de movimiento: traslación pasiva y desplazamiento ameboideo activo. El primero ocurre cuando las CGP aparecen entre las células epiteliales del saco vitelino, las cuales están en continuidad con el epitelio del intestino posterior a través de la

alantoides. Se ha observado que durante el crecimiento del embrión, parte del epitelio del saco vitelino se incorpora al intestino de manera que las CGP se encuentran localizadas en el epitelio del intestino posterior. Mediante su capacidad de movimientos ameboides las CGP abandonan este sitio, migrando hacia las crestas urogenitales (Allegrucci et al. 2005).

*In Vitro* las crestas genitales de ráton 10.5 días secretan TGF- $\beta$ 1 proteína capaz de atraer a las CGPs (Godin et al., 1991), otra proteína que puede participar es SDF1 (Molyneaux et al. 2003).

En el ráton la formación de los vasos sanguíneos testiculares es por la migración de células endoteliales mesonefricas a los futuros testículos. Si se bloquea la migración de las células mesonefricas no se desarrollan los cordones testiculares, por lo que estas células juegan un papel crítico en la formación de los cordones testiculares. (DeFalco y Capel 2009)

Las gónadas adquieren características morfológicas femeninas o masculinas en la séptima semana, al final de la etapa embrionaria en el humano, a los 12.5 días en la rata, a los 42 días en el bovino y al 7<sup>o</sup> día en el embrión de pollo.

En las aves las CGPs se originan del ectodermo y migran a una zona en forma de media luna de la capa endodérmica (media luna germinal) donde se multiplican. La ruta de migración de las CGP en aves y algunos reptiles primitivos como Sphenodon punctatus, es a través de la sangre, las CPGs entran al torrente sanguíneo a través de los vasos sanguíneos por diapédesis y son transportadas hasta las crestas urogenitales (revisado: Merchant-Larios 1978; Gilbert 2005).

Una vez incorporadas las células germinales en la gónada indiferenciada inician un activo proceso de proliferación que

coincide cronológicamente con la proliferación de las células somáticas mesenquimatosas y del epitelio celómico.

En la gónada indiferenciada empieza un proceso de diferenciación sexual, si va a ser un ovario las células germinales permanecen en la corteza de la gónada, en tanto que el paso de las células a la médula se asocia con el desarrollo de un testículo. La gónada indiferenciada contiene todos los componentes celulares necesarios para su diferenciación en testículo o en ovario, es decir, tejido medular que formará los cordones medulares de los testículos; tejido cortical formado a partir del epitelio celómico, que puede formar los cordones corticales o sea el sustrato del ovario; mesénquima que formará el resto de las gónadas de ambos sexos incluyendo la teca y el tejido intersticial, contiene también las CGP que formarán las ovogonias o las espermatogonias, de acuerdo con la información genética.

El ovario se caracteriza por una diferenciación de la corteza, las células germinales residen en la superficie de la gónada y los cordones sexuales degeneran, el epitelio celómico produce una nueva generación de cordones sexuales, los cordones corticales, mientras que la médula experimenta regresión. En la formación del testículo la médula aumenta de tamaño y se diferencia, mientras que la corteza generalmente involuciona

### **DIFERENCIACIÓN Y MORFOGENESIS GÓNADAL**

#### **\* AVES**

En las aves, el complemento cromosómico es 38 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales (ZW o ZZ). La hembra es heterogamética ZW y el macho es homogamético ZZ (Smith y Sinclair 2004; Smith 2010).



El sexo genético es determinado en la fecundación, el morfológico puede ser distinguido alrededor de 6.5 días de incubación por la diferenciación del epitelio germinativo y la presencia de las células primordiales germinales (CGPs). En general, la diferenciación de las gónadas es distinguible a los 6.5 días de incubación (Villalpando et al. 2000; Bruggerman 2002). Las gónadas ZW heterogaméticas desarrollan una asimetría en los ovarios por la regresión del ovario derecho, mientras los testículos ZZ homogaméticos son simétricos.

En las aves, la diferenciación de las gónadas no está estrictamente determinada por el sexo genético como en los mamíferos, las hormonas sexuales pueden influir durante la diferenciación. El estradiol juega un papel importante en la diferenciación de las gónadas en aves (Scheib 1983; Hudson et al. 2005). Las enzimas requeridas para la producción de estradiol, son la P450aromatasa y 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa que se expresan únicamente en la gónada femenina en el 6 día del desarrollo gonadal (Nakabayashi et al. 1998). La importancia del estradiol en el desarrollo de la gónada femenina ha sido demostrada usando inhibidores la aromatasa. La administración de inhibidores de aromatasa induce a la gónada femenina a transformarse en testículo, y la administración de estradiol induce un ovotestis en el macho genético (Nakabayashi et al. 1998; Shimada 1998; Kanda et al. 2000; Barske y Capel 2010; Smith 2010).

En los embriones de pollo, las gónadas son esteroidegenicamente activas desde etapas tempranas. Andrews y col. en 1997 detectaron el receptor de estradiol (cER) a los 4.5 días de incubación en las gónadas indiferenciadas y su expresión continuó después del dimorfismo sexual a los 7.5

días de incubación, por otro lado el mRNA-ER fue detectado de los 7 a los 10 días en los machos (Nakabayashi et al. 1998). El gen para aromatasa en pollo (cAROM) se expresa en ambas gónadas a los 5-6 días de incubación, después únicamente en el ovario. (Villalpando et al. 2000; Nishikimi et al. 2000; Bruggeman et al. 2002). Esto sugiere que ambas gónadas tienen la capacidad de responder a estrógenos antes de la diferenciación morfológica, después la capacidad de síntesis de estrógenos es específica del ovario (Andrews et al. 1997; Bruggeman et al. 2002; Smith 2010).

La activación de la enzima aromatasa y  $17\beta$ -HSD en la gónada femenina no es clara, pero el factor de transcripción FOXL2 es requerido para el desarrollo del ovario (Hudson et al. 2005). Con técnicas de biología molecular se han detectado los mRNA de P450scc,  $3\beta$ -HSD, P450c17,  $17\beta$ -HSD en ambas gónadas y en ambos sexos desde el 5º día de incubación, esto nos indica que los mRNA de las enzimas esteroidogénicas están presentes desde antes de la diferenciación gonadal (Nomura et al. 1999; Bruggeman et al. 2002).

Por otro lado, la expresión del gen aromatasa y  $17\beta$ -HSD se detecta claramente en el día 6.5 en gónadas femeninas (Nakabayashi et al. 1998; Bruggeman et al. 2002).

### **Expresión de genes en el desarrollo gonadal en aves**

En la expresión de genes durante el desarrollo de las gónadas de aves se encuentra el cSox9 ("c" de Chicken) el cual es autosómico y comparte homología estructural y funcional con SRY (Oreal et al. 2002; Kobayashi et al. 2005). En la gónada de embriones de pollo de 6.5-7.5 días de incubación se ha observado la expresión del gen cSox9 y se ha identificado en

las células de Sertoli en el testículo del embrión de pollo (Smith y Sinclair 2001, 2004; Smith 2010).

Se han estudiado la expresión de los genes *Amh*, *Sox9*, *Wt1*, *Sf1* y *Dax1* durante la diferenciación gonadal de las aves. El mRNA de la hormona antimulleriana de pollo *cAmh* se expresa antes de la diferenciación sexual en ambos sexos, y su expresión precede a la *cSox9* el cual es específico para machos. El *cSox9* y *WT1* tiene una expresión alta en ambos sexos durante el periodo de diferenciación gonadal. El *Sf1* y *Dax1* son también expresados antes y durante la diferenciación gonadal. *Sf1* inicia la regulación de esteroides después de la diferenciación del ovario. Fig 1. La expresión de *Dax1* es similar en ambas gónadas y no regula al testículo durante la diferenciación como ocurre con el ratón. (Smith y Sinclair 2001, 2004). El desarrollo morfológico de las gónadas en las aves conserva un modelo de desarrollo similar al de los mamíferos.

En las aves en el día 3.5 (estadio 22) inicia la embriogénesis de las gónadas. En el día 5.5 (estadio 28) la gónada bipotencial se ha formado (ambas derecha e izquierda) en machos y hembras, el sexo morfológico se puede distinguir en el día 6.5 (estadio 30) y los cordones testiculares están formados en el día 7.5 (estadio 32). (Smith y Sinclair 2001; Morrish y Sinclair 2002; Smith 2010).

En las aves es característico el establecimiento de una asimetría gonadal en las hembras con un desarrollo unilateral del ovario y del oviducto izquierdo (Morrish y Sinclair 2002). El desarrollo asimétrico de las gónadas de pollo está regulado por el factor de transcripción *Pitx2*, el cual se localiza en la gónada izquierda. El mecanismo de asimetría es mediado por la vía de señalización RA. RA es únicamente producido en la

gónada derecha, donde suprime la expresión de SF-1 y al receptor alfa de estradiol. En ausencia de RA en la gónada izquierda cyclin D1 regula y estimula la división celular. (DeFalco y Capel 2009).

El ovario está situado en lado izquierdo del cuerpo en el extremo cefálico de los riñones y está unido a la pared somática por el ligamento mesovarico.

El ovario derecho crece normalmente hasta el octavo o décimo día, sufriendo una regresión al día doce de vida embrionaria, tendiendo a convertirse en un ovario diminuto y rudimentario al nacimiento (Teng y Teng 1979; Morrish y Sinclair 2002).

Por otro lado en el ovario izquierdo aumenta el tejido epitelial, el estroma y los vasos sanguíneos, hasta formar un ovario con dos regiones topográficas bien definidas, la corteza y la médula. La corteza ovárica muestra cordones corticales constituidos por ovogonias y células prefoliculares. En la médula se desarrollan cordones de células secretoras de esteroides (Morrish y Sinclair 2002; DeFalco y Capel 2009), así como un sistema lacunar característico de la gónada femenina (González del Pliego et al. 1988). Los folículos son la unidad funcional más importante del ovario, están formados por la granulosa y la teca que aparte de crear el microambiente del ovocito son el principal origen de las hormonas esteroides. En las aves, la producción de progesterona es la granulosa, mientras que la secreción de  $17\beta$ -estradiol, testosterona y androstenediona por las células de la teca (Marrone et al. 1985; Gómez et al. 1998).

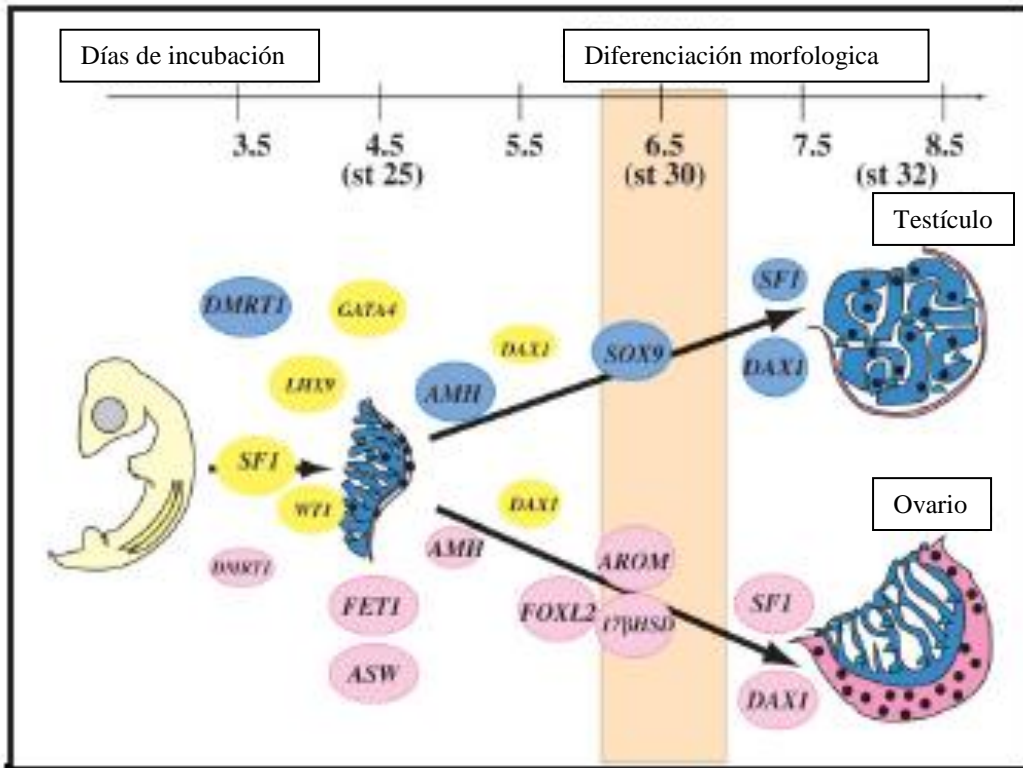


Fig 1. Expresión de genes durante la diferenciación gonadal del embrión de pollo. Los círculos denotan el inicio de la expresión de genes. Círculos azules, expresa los genes del macho, círculos rosas, la expresión de genes femeninos, círculos amarillos la expresión de genes en ambos sexos. (Tomado de Smith y Sirclair 2004).

## BIOSINTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES

Los esteroides son lípidos no saponificables, poco solubles en agua, solubles en disolventes orgánicos y con un núcleo común que es el ciclopentanoperhidrofenantreno hidrocarburo cíclico constituido por diecisiete átomos de carbono dispuestos en tres anillos de seis carbonos cada uno que se designan como anillos A, B, C, y un anillo de cinco átomos de carbono que corresponde al anillo D.

Todos los esteroides derivan de alguno de los siguientes hidrocarburos básicos: colestano, pregnano, androstano y estrano (Fig.2) (Payne y Hales 2004; Hu et al. 2010).

El colestano es un hidrocarburo de 27 átomos de carbono (C-27) que es la estructura química básica a la cual pertenece el colesterol que es la molécula precursora de las hormonas esteroides (Payne y Hales 2004).

El pregnano es un hidrocarburo de 21 átomos de carbono (C-21) característico de las hormonas esteroides con actividad progestacional, glucocorticoide, y mineralocorticoide.

El androstano es un hidrocarburo de 19 átomos de carbono (C-19) que es la estructura química básica de las hormonas esteroides con actividad androgénica.

El estrano es un hidrocarburo de 18 átomos de carbono (C-18) en la cual se incluyen los esteroides con actividad estrogénica (Hu et al. 2010).

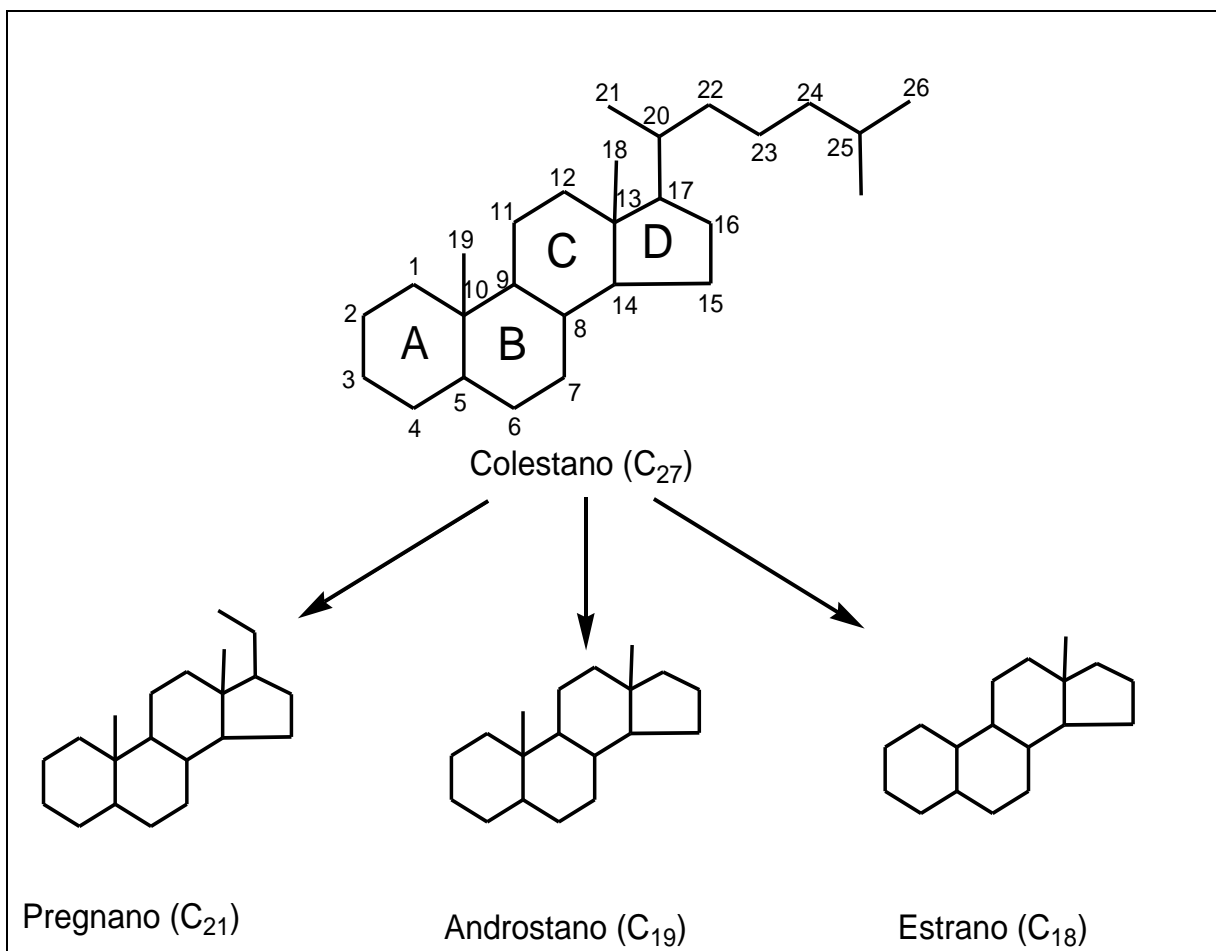


Fig 2. Núcleos básicos de los diferentes tipos de hormonas esteroides. El subíndice indica el número de átomos de carbono de cada núcleo esteroide.

## **BIOSINTESIS DEL COLESTEROL**

El colesterol es un intermediario obligado en la biosíntesis de hormonas esteroideas, las células esteroideogénicas utilizan colesterol que proviene de tres fuentes: 1) la síntesis "de novo" a partir de acetato, 2) incorporación de lipoproteínas del torrente sanguíneo, 3) las gotas intracelulares de ésteres del colesterol del citoplasma (Hu et al. 2010).

La biosíntesis "de novo" de colesterol es a partir de precursores que no tengan la estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno, es decir a partir de acetato. En este proceso de biosíntesis se requiere de por lo menos 27 enzimas localizadas en la fracción microsomal (Fig 3) (Payne y Hales 2004; Liu et al. 2006).

## **BIOSINTESIS DE PREGNENOLONA**

Una vez que el colesterol es biosintetizado en el interior de las células esteroideogénicas, es necesario que penetre a la membrana interna de las mitocondrias, donde la acción de liasas e hidroxilasas desdoblan y oxidan la cadena lateral originando la pregnenolona (Payne y Hales 2004). La primera hidroxilación ocurre en el C-20 seguida de otra en el C-22, formándose  $20\alpha$ ,  $22\beta$ -dihidroxicolesterol. Este proceso es catalizado por la  $20\alpha$  y  $22\beta$  hidroxilasa, enzimas que requiere la presencia del citocromo P450, el cual se conoce como enzima de degradación de la cadena lateral; P450<sub>scc</sub> o CYP11A (Miller 2008). También requiere de adrenodoxina y de una flavoproteína deshidrogenasa dependiente de NADPH. Posteriormente se oxida el diol por un sistema enzimático mitocondrial conocido como 20, 22-esteroide liasa que



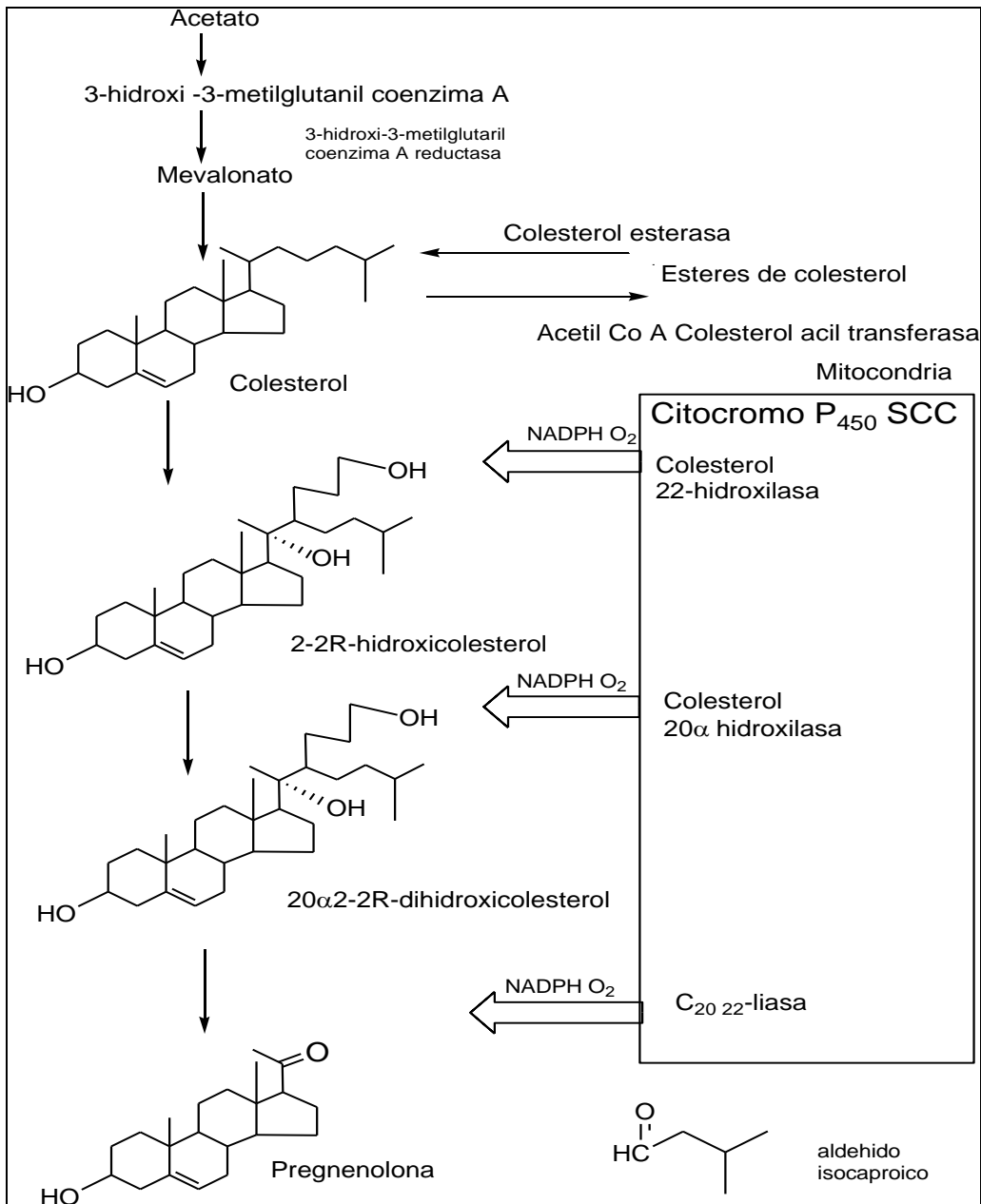


Fig 3. Vía de síntesis de la pregnenolona a partir de colesterol, ilustrando el mecanismo de ruptura de la cadena lateral del colesterol en la mitocondria. Enzima involucrada el citocromo P450scc.

requiere NADPH Y O<sub>2</sub>, dando lugar a la ruptura de los átomos de C-20 y C-22, obteniendo la pregnenolona (Fig 3) (Miller 2005; Hu et al. 2010).

La hidroxilación en la posición alfa del C-20 del colesterol es lo que se conoce como "paso limitante" es decir es un evento indispensable para la formación de la pregnenolona. Este "paso limitante" es activado por hormonas troficas de naturaleza peptídica: hormona luteinizante (LH) en el ovario y el testículo, gonadotropina coriónica (hCG) en la placenta y hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la corteza suprarrenal. Es a este nivel donde ocurre la regulación de la esteroidogenesis.

### **BIOSINTESIS DE PROGESTERONA**

La formación de progesterona a partir de pregnenolona requiere inicialmente una deshidrogenación, realizada por la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa  $\Delta$ 5-isomerasa (3 $\beta$ -HSDH,  $\Delta$ 5 isomerasa) del grupo alcohólico en el C-3, formándose la 4-pregnen-3,20 diona. Inmediatamente por un proceso de isomerización de este compuesto, que implica la migración del doble enlace 5-6 a la posición 4-5 se forma la progesterona. La progesterona ocupa un lugar clave en la biosíntesis de esteroides, ya que puede ser biosintetizada como producto terminal o bien servir como precursor de corticoesteroides, andrógenos y estrógenos. Esto ocurre en la fracción microsomal (Fig 4) (Simard et al. 2005; Hu et al. 2010).

## BIOSINTESIS DE ANDROGENOS

La pregnenolona y la progesterona se biotransforman en andrógenos como la dehidroepiandrosterona y la androstenediona por una hidroxilación en el C-17 de la pregnenolona o de la progesterona es el primer paso para la ruptura de la cadena lateral, y es catalizado por la enzima  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona o  $17\alpha$ -hidroxiprogesteroína respectivamente. Posteriormente por acción de una  $17, 20$  esteroide liasa se rompe la unión entre los átomos C-17 y C-20, el citocromo que realiza esta acción P450c17 o CYP17 (Payne y Hales 2004). La acción secuencial de estas dos enzimas de localización microsomal es dependiente de NADPH y  $O_2$ .

La utilización de la vía  $\Delta 5$  o de la vía  $\Delta 4$  como precursores de los andrógenos operan simultáneamente, y el predominio de una de ellas, depende del tejido.

La ruptura de la cadena lateral da lugar a la formación de androstenediona y dehidroepiandrosterona. La reducción del grupo cetónico del C-17 de la androstenediona, por acción de la  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, transforma a este andrógeno de baja potencia biológica a testosterona que es un andrógeno biológicamente activo. Esta acción es reversible.

La dehidroepiandrosterona por acción de la  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa es transformada a 5-androstendiol el cual por acción del sistema enzimático  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/  $\Delta 4$  5-isomerasa es bioconvertido a testosterona (Miller 2008) (Fig 4).

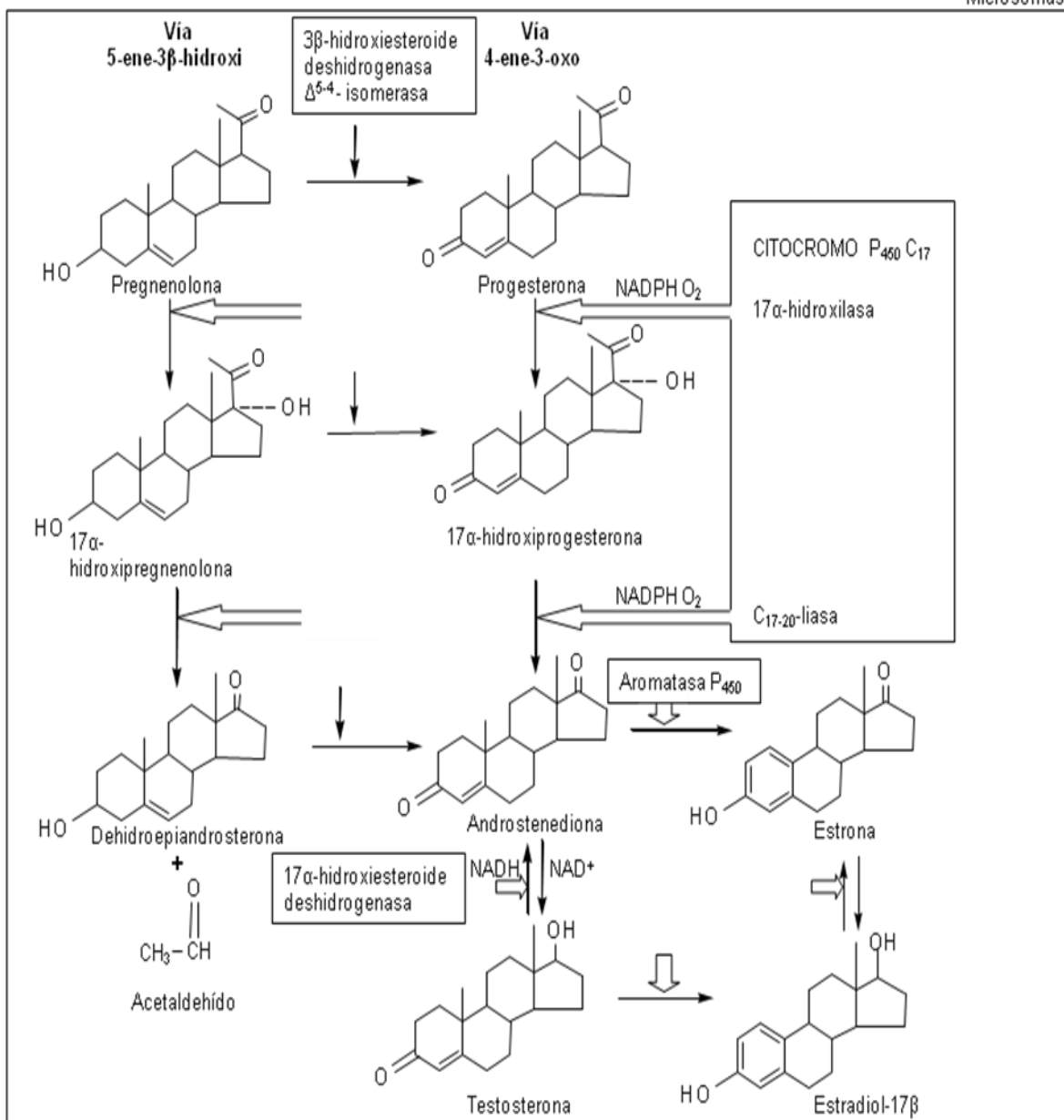


Fig 4. Metabolismo de la pregnenolona para la formación final de estrógenos. Se representan los diferentes complejos enzimáticos involucrados, los intermediarios y las vías  $\Delta^4$  y  $\Delta^5$  para la síntesis de estrógenos en el ovario.

## BIOSINTESIS DE ESTROGENOS

Los andrógenos se transforman en estrógenos, por acción de la aromatasas (citocromo P450 $\alpha$ ), en este proceso, además de la pérdida del átomo de carbono 19, el anillo A neutro de los andrógenos se transforma en un anillo aromático o fenólico característico de los estrógenos (Fig 4). La androstenediona puede ser directamente aromatizada a estrona o primero convertirse a testosterona por la acción de la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y aromatizarse luego a estradiol.

La 17 $\beta$ -hidroxilación de androstenediona a testosterona o de estrona a estradiol, son reacciones reversibles y juegan un papel de regulación en la cantidad de estrógenos producidos por el ovario. (Payne y Hales 2004).

Esta síntesis de esteroides tiene lugar en dos membranas; en la interna de la mitocondria y en la del retículo endoplásmico (microsoma).

En el ovario humano el colesterol es convertido a pregnenolona en la membrana interna de la mitocondria, la pregnenolona a progesterona en los microsomas y la 17 $\beta$ -hidroxilación de progesterona ocurre en el citoplasma. En el retículo endoplásmico liso se realiza la síntesis de los esteroides a partir de la pregnenolona que fue sintetizada por la mitocondria, es aquí en el microsoma donde se lleva a cabo la aromatización de los esteroides (Payne y Hales 2004; Hu et al. 2010).

## **TRANSPORTE DE LAS HORMONAS ESTEROIDES**

Una vez sintetizadas las hormonas esteroides son liberadas a la circulación sanguínea, donde se fijan a proteínas plasmáticas. La testosterona y la dehidrotestosterona se unen fuertemente a la globulina de transporte llamada globulina fijadora de hormona sexual (SHBG; sex hormone binding globulin) y con menor afinidad a la albúmina. Mientras que el  $17\beta$ -estradiol, estrona, antrostenediona y progesterona se une con gran afinidad a la albúmina para su transporte plasmático. La SHBG se sintetiza en el hígado y su síntesis se estimula por los estrógenos y se inhibe por los andrógenos (Avvakumov et al. 2009)

## **RECEPTORES NUCLEARES**

Los receptores nucleares son factores transcripcionales que juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica. Actualmente se conocen 50 proteínas pertenecientes a esta superfamilia génica y entre ellas existe una notable similitud estructural. Después de interactuar con sus ligandos específicos, los receptores nucleares se unen a regiones específicas del genoma y modifican la transcripción de numerosos genes. Los receptores nucleares más estudiados han sido de las hormonas esteroides (estrógenos, andrógenos, progesterona, glucocorticoides y mineralcorticoides). Estos receptores, se unen con alta afinidad ( $K_d$  en el rango de nanomoles) y especificidad a sus ligandos y forman homodímeros para interactuar con el ADN (Cortés et al. 2005). Por otro lado para muchos de los receptores no existe un ligando

conocido, por lo que se les denomina "receptores huérfanos". Estos receptores huérfanos unen sus ligandos con mayor afinidad ( $K_d$  en el rango de micromolar) y presentan un repertorio más amplio. Estos receptores funcionan predominantemente como heterodímeros del receptor retinoide X (RXR), por lo que también se les conoce como receptores heterodiméricos (RNH) (Cortés et al. 2005; Germain et al. 2006).

Algunos receptores, como el de los glucocorticoides, en ausencia de ligando se encuentran asociados a otras proteínas, proteínas de choque térmico Hsp90, que lo retienen en el citoplasma. Tras la unión del ligando el receptor sufre un cambio conformacional por el cual se disocia del complejo citoplasmático y es transportado al núcleo. El complejo hormona-receptor se une a secuencias específicas de ADN, los denominados "elementos de respuesta hormonal" o HRE y, como consecuencia, se produciría un cambio en la velocidad de transcripción de los genes que contienen dichos elementos (Zhou y Cidlowski 2005).

Los receptores nucleares tienen una estructura modular, y están formados por diferentes regiones que corresponden con dominios funcionales autónomos.

Un receptor típico nuclear tiene un extremo N-terminal en la región (A/B), un dominio de unión al ADN (DBD) o región C, una región bisagra D, y una región E/F carboxiloterminale que contiene el dominio de unión al ligando (LBD). Estos receptores nucleares también contienen dos dominios de activación transcripcional, un dominio de activación transcripcional independiente del ligando (AF-1), que se encuentra en la región A/B, y un dominio de activación transcripcional dependiente del ligando (AF-2), localizado en el extremo

C-terminal (Fig. 5) (Zhou y Cidlowski 2005; Germain et al. 2006).

La **región A/B** es la más variable y tiene el extremo N-terminal. El dominio de unión a ADN, el **dominio C**, es el que tiene mayor homología y está compuesta por 2 "dedos de Zinc" en los que un átomo de zinc coordina tetraédricamente cuatro cisternas. Este dominio está formado por 2 hélices  $\alpha$  y, a través de la primera, los receptores se unen con alta afinidad al surco mayor del ADN y conoce secuencias específicas denominadas elementos de respuesta hormonal (HRE).

El **dominio D** sirve como bisagra entre DBD y LBD permitiendo la rotación del DBD. En muchos receptores contiene una señal de localización nuclear que aunque no forma parte de la superficie de interacción son necesarios para la unión de estos receptores.

**Dominio E**, el dominio de unión al ligando (LBD) es la zona de unión al ligando, mediante la dimerización de los receptores, la unión con proteínas de choque térmico y en algunos casos la represión transcripcional (Robyr et al. 2000; Germain et al. 2006).

Los elementos de respuesta a hormonas (HRE) son sitios específicos de unión de alta afinidad de los receptores y se encuentra generalmente localizada dentro de las primeras -220 a -300 pares de bases con respecto al sitio de inicio de la transcripción.

La secuencia de los HRE de los receptores de esteroides es un palíndromo (Pal) de secuencia AGAACA espaciada por tres nucleótidos no conservados (Bottino y Lanari 2010).



Algunos receptores nucleares son monoméricos, la mayoría se une a las HRE como dímeros. Los receptores monoméricos utilizan la extensión carboxiterminal de DBD para aumentar sus contactos con el ADN y estabilizar la unión al HRE. En el caso de los dímeros, cada monómero reconocería la mitad del palíndromo. La región E contiene una serie de heptadas hidrofóbicas, a través de la cual interaccionan los monómeros de los receptores de esteroides.

El homodimero es la forma activa de los receptores de esteroides. Sin embargo, muchos receptores se unen a los HRE como heterodímeros. Los heterodímeros, el receptor X de retinoides (RXR) sirven de pareja para los demás receptores (Germain et al. 2006; Bottino y Lanari 2010).



## **MECANISMO DE ACCION DE LAS GONADOTROPINAS (FSH y LH)**

Las gonadotropinas hipofisaria; la Hormona Folículo Estimulante (FSH), y la Hormona Luteinizante (LH), son dímeros compuestos por dos subunidades polipeptídicas glucosiladas ( $\alpha$  y  $\beta$ ), con pesos moleculares de 33 000 y 28 000 respectivamente. El contenido de carbohidratos (27% en FSH) y, en particular el contenido de ácido siálico (5% en FSH y 1.4% en LH) son esenciales para su acción biológica. La subunidad  $\alpha$  de la LH, FSH y la de la gonadotropina coriónica humana (hCG) es común a las hormonas glucoproteicas. En contraste, la subunidad  $\beta$  de cada hormona tiene una secuencia de aminoácidos distintiva que impone la actividad específica que se expresa cuando esta subunidad se asocia con la unidad  $\alpha$ . La vida media inicial plasmática de LH es de 30 min, mientras que la de FSH es de 3 h (Lee et al. 2008).

Estas gonadotropinas se producen en el lóbulo anterior de la hipófisis controlada por factores de liberación (GnRH) que son transportados del hipotálamo por el sistema porta hipotalámico-hipofisario. La FSH y LH son secretadas por las células basófilas de la hipófisis, mientras que las células acidófilas producen la prolactina.

La secreción hipotalámica de la FSH y LH es regulada por medio de la retroalimentación negativa de la inhibina que es liberada por los ovarios y testículos inhibiendo así la secreción de estas gonadotropinas (Richards y Pangas 2010).

El ritmo de secreción de las gonadotropinas es pulsátil con una frecuencia y amplitud variables en el ciclo menstrual (más frecuentes y con mayor amplitud hacia la ovulación, decreciendo en frecuencia y amplitud tras la ovulación) (Cheng y Leung 2005; Lee et al. 2008).

El mecanismo de acción de las gonadotropinas se realiza a través de la unión de la hormona con un receptor específico en la superficie celular.

Como todos los componentes celulares, los aceptores de membrana están en constante estado de movimiento y recambio. La síntesis da comienzo en el retículo endoplásmico rugoso (RER) donde las proteínas destinadas a la membrana plasmática se sintetizan y son derivadas de otras proteínas, por la presencia de su secuencia de señal y otras determinantes conformacionales.

Los receptores (R) inmaduros pasan al complejo de Golgi donde sufren algún tipo de modificación como glicosilación, acilación de ácidos grasos, formación de puentes disulfuro y en algunos casos escindidos en subunidades. El R sufre la fusión de vesículas en su trayecto desde el complejo de Golgi a la membrana plasmática, para luego ser incorporado a la membrana plasmática, quedando ya posibilitado de unirse a un ligando y transducir señales bajo circunstancias fisiológicas en que se produce la estimulación hormonal de las células.

El tiempo de síntesis del R estará en dependencia de su degradación, por tanto se mantiene un pool constante de R (síntesis-degradación), y las alteraciones en la síntesis resultan en el cambio de su número y alteración de su función biológica. Lo más común de esta situación es la capacidad de muchas hormonas peptídicas para degradar sus propios R, iniciando una regulación descendente de su número (Richards y Pangas 2010).

Los receptores tienen varias subunidades; un dominio extracelular, transmembranal e intercelular.

Los receptores de las hormonas gonadotropinas están localizados en la membrana plasmática, donde interactúan con las hormonas presentes en el líquido extracelular.

Los receptores LH y FSH están acoplado con un subgrupo de proteínas reguladoras que se unen al guanósín trifosfato (GTP), o proteína G, que activa el sistema de proteincinasa A (Fig 6).

La interacción de las gonadotropinas con sus receptores conduce a la activación de estos últimos, por cambios conformacionales en la estructura del receptor. La formación del complejo gonadotropina-receptor determina el remplazo del GTP unido a la subunidad alfa por guanósín difosfato, lo que conduce a la disociación de la subunidad alfa del complejo beta-gama (Lee et al 2008).

Las proteínas G están constituidas por un heterotrímero formado por una subunidad alfa y un complejo beta-gamma, la subunidad alfa posee actividad de GTPasa.

La subunidad alfa libre se une a la adenilato ciclasa, que convierte el adenosín trifosfato en AMPc, lo que activa a la proteincinasa A.

En su forma inactiva la subunidad alfa tiene GDP (difosfato de guanosina) unido y forma parte del trímero alfa-beta-gamma. La unión de la hormona a su receptor promueve la interacción y activación de las proteínas G a través de la liberación de GDP y su reemplazo por una molécula de GTP (trifosfato de guanosina), como consecuencia de este intercambio se altera la

configuración de la subunidad alfa y se produce la disociación del complejo beta-delta libre que pueden ahora interactuar con distintas proteínas produciendo su activación o inactivación.

Estudios recientes han modificado la visión clásica sobre el dímero beta-delta en su función en el mecanismo de transducción de señales y se sabe ahora que juega un papel activo pues se han descrito efectos sobre la fosfolipasa C, la adenilato ciclasa y los canales de potasio; además este complejo contribuirá a otorgar especificidad al acoplamiento de las proteínas G a distintos receptores.

Los receptores de las hormonas glucoproteicas están acoplados a través de las proteínas G a la adenilato ciclasa presentes en las membranas de las células efectoras.

La adenilato ciclasa activada cataliza la conversión del ATP en AMP-cíclico en el interior del citoplasma. El AMP-cíclico activa las enzimas proteína quinasa de serina/treonina denominada proteína kinasa A (PKA), a través de la unión a las subunidades regulatorias (sR) y liberación de la subunidad catalítica (sC) estas últimas inician una cascada de fosforilaciones, tanto a nivel del citoplasma donde se traslocan una vez activadas. El incremento del AMPc es transitorio pues se inactiva rápidamente por una fosfodiesterasa (Vien et al 2008).

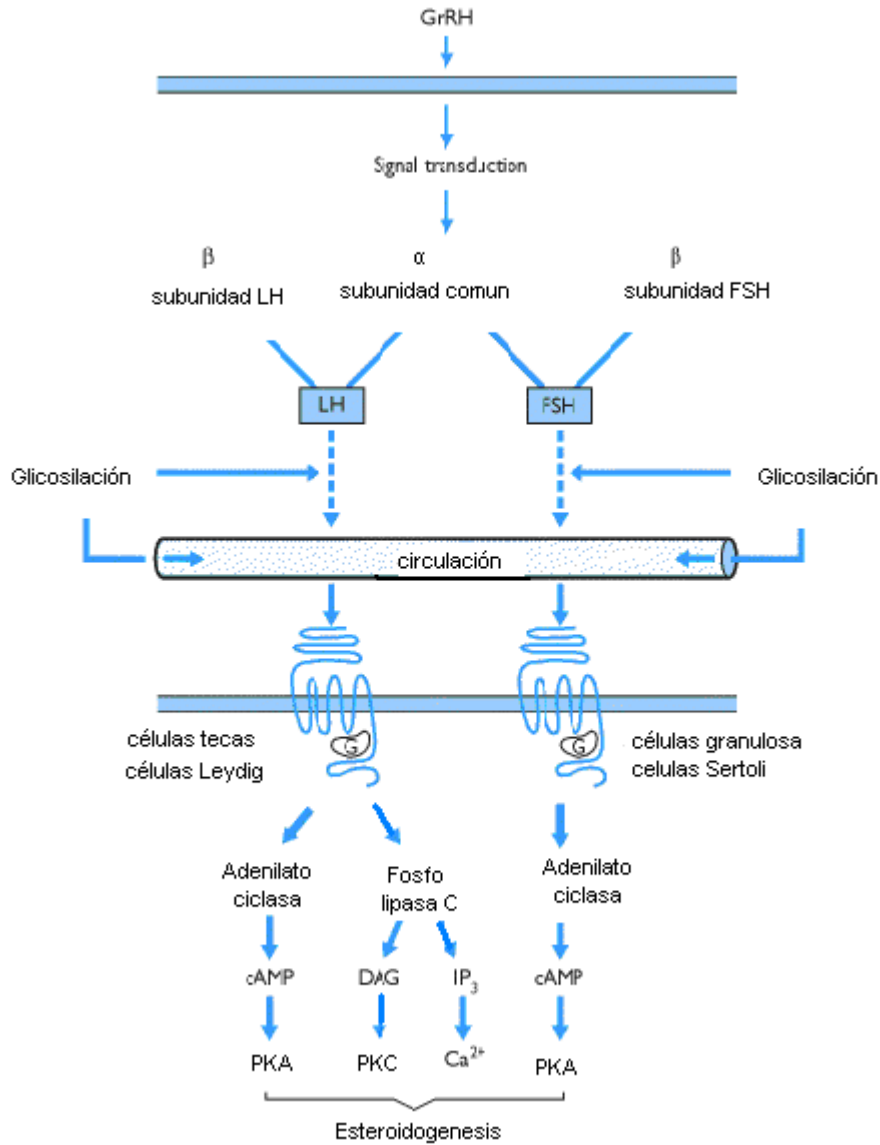


Fig 6. Acción de las gonadotropinas. GnRH estimula la transcripción de los genes que codifican para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de LH y FSH. La glicosilación ocurre en la hipófisis y puede ser modificada en la circulación. Las gonadotropinas interactúan con sus receptores-proteína G, estimulan a la adenilato ciclasa y en consecuencia el aumento de cAMP.

## **ESTEROIDOGENESIS DURANTE EL DESARROLLO DEL OVARIO EN AVES**

Durante el desarrollo embrionario del ovario de las aves, se ha descrito la síntesis de hormonas esteroides a partir de los 7 días de incubación, habiéndose identificado la producción de  $17\beta$ -estradiol, estrona, progesterona y testosterona (Weniger y Zeiz 1987; Galli y Wesserman 1973; Guichard et al. 1973; Teng y Teng 1977; Alvarez et al. 1995).

Se sabe que durante el periodo de gónada indiferenciada, en el embrión de pollo los futuros ovarios y testículos sintetizan estrógenos y andrógenos (Woods y Erton 1978). La producción de esteroides aumenta durante el desarrollo de las gónadas en ambos sexos, en los ovarios hay mayor producción de estrógenos que en los testículos, esto podría ser obvio por el sexo pero la producción de testosterona también es mas alta que en las hembras hasta el día 15 del desarrollo, después es lo contrario en el macho hay mayor cantidad de testosterona (Guichard et al. 1977a).

Estudios morfológicos e histológicos han demostrado que las células responsables de la producción de esteroides son las células intersticiales situadas en la médula del ovario del embrión de pollo (Narbaitz y Adler 1966; Jordanov et al. 1978). Estas células esteroidogénicas son claramente identificadas durante las últimas semanas del desarrollo de los pollos, se caracterizan ultraestructuralmente porque tienen en su citoplasma mitocondrias con crestas tubulares, retículo endoplasmico liso, polirribosomas, abundantes gotas de lípidos (Jordanov et al., 1978; González del Pliego et al., 1988) colesterol y una reacción positiva a  $3\beta$ -HSD (Narbaitz y Robertis 1964, 1968).



Las células esteroideogénicas están agrupadas en cordones en la médula subcortical y adquieren gran desarrollo al aproximarse la eclosión, ocupando el 18% de la médula externa en los ovarios de pollo con 24 horas de vida (González-Moran et al. 1985).

En etapas tempranas el desarrollo de las gónadas en las aves es independiente de la hipófisis. Esto sugiere que durante ese tiempo las hormonas son producidas en forma autónoma por la gónada. La adenohipófisis empieza a sintetizar gonadotropinas en las aves a los 13.5 días de incubación (Gilbert 1971).

Weniger y col. 1987, 1991 realizaron una serie de experimentos para establecer cuándo la hipófisis inicia el control de la secreción de esteroides por el ovario. En embriones de pollo de 8 a 19 días de incubación, hipofisectomizados o con una operación-simulada, se cuantificó por RIA la cantidad de  $17\beta$ -estradiol liberado por el ovario al medio. Los resultados permiten concluir que la hipófisis controla la secreción de  $17\beta$ -estradiol en el ovario de pollos desde los 11.5 días de incubación.

Otros estudios realizados indican que las condiciones para un posible control antes de los 11.5 días como son; que el ovario responde a LH exógena a los 7.5 días de incubación con el aumento de testosterona y  $17\beta$ -estradiol en el plasma (Cedard et al. 1968; Teng y Teng 1977; Guichard et al. 1979; Woods et al. 1981; Weniger y Chouraqui 1988). Además la LH es detectable por inmunoreactividad en la hipófisis anterior del embrión de pollo a los 4 días, y es medible en el plasma de embriones de 10.5 días. Por otra parte, los receptores de LH están presentes en las células intersticiales del ovario de 13.5 días de incubación (Woods et al. 1989).

La temprana respuesta "in vitro" de la gónada a la LH, no nos indica que ya este establecido el eje hipófisis-gonada, sino hasta que es detectable LH en la circulación sanguínea del embrión por lo que el eje hipotálamo-hipófisis-gónada funciona independientemente hasta el día 13.5 de incubación en machos y el 14.5 en hembras (Gilbert 1971; Woods et al. 1981).

Cuando se estimula el ovario con hormona luteinizante (LH) o con gonadotropina coriónica humana (hCG) se obtiene un aumento de la producción de  $17\beta$ -estradiol (E2), testosterona (T), progesterona (P4) y adenosin monofosfato cíclico (AMPC) (Cedard et al. 1968; Teng y Teng 1977; Guichard et al. 1979).

El tamaño morfométrico de las células esteroideogénicas también aumenta cuando se estimula con hCG, sus organelos citoplasmáticos sufren modificaciones como; incremento de las vesículas del retículo endoplásmico liso, hay aumento en el número de mitocondrias con crestas tubulares, las gotas de lípidos del citoplasma son abundantes, el aparato de Golgi esta bien desarrollado y se presentan cambios evidentes en el retículo endoplásmico rugoso y polirribosomas (Gonzales del Pliego et al. 1988).

La FSH en las células de la granulosa de mamíferos induce varias enzimas esteroideogénicas,  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD) (Richards J.S., 1990; Lee et al. 2008), citocromo P450arom (P450arom) (Erickson y Shimasaki 2001; Conley y Hinshelwood 2001) y  $20\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $20\alpha$ -HSD) (Jones y Hsueh 1982), aumentando la producción de progesterona, estradiol y  $20\alpha$ -hidroxiprogesterona respectivamente.

En las células de la granulosa de cerdo la acción de la FSH induce la producción de estrógenos (aromatasa) que es mediada a través de AMPc. Por otro lado la LH estimula la esteroidogénesis en las células intersticiales del ovario a través de AMPc (Zelevnik et al. 1974; Richards et al. 1990). La hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica humana (hCG) estimulan la secreción de hormonas esteroideas en el ovario del embrión de pollo, esta estimulación ha sido registrada "in vivo" e "in vitro" en los ovarios de embriones de pollo de 8 a 18 días de incubación (Teng et al. 1982; Wood y Brazzil 1981).

## JUSTIFICACION

Estudios ultraestructurales y bioquímicos han demostrado que el ovario de embriones de pollo es esteroideogénicamente activo (Narbaitz y Adler 1966; Woods y Erton 1978), confirmando con ello las descripciones previas de que las células del ovario son positivas a la enzima  $3\beta$ -HSD (Narbaitz y Kolodny 1964).

La biosíntesis de  $17\beta$ -estradiol y estrona en el ovario del embrión de pollo ha sido demostrada desde los 7-8 días de incubación (Galli y Wassermann 1973; Guichard et al. 1973; Woods y Erton 1978,). La secreción *in vitro* de  $17\beta$ -estradiol y estrona en el ovario del pollo ha sido medida por radioinmunoanálisis (RIA) Guichard et al. 1977a y b).

La hormona luteinizante y la gonadotropina coriónica humana estimulan la secreción de hormonas esteroides en el ovario de embriones de pollo, esta estimulación ha sido registrada "*in vivo*" e "*in vitro*" en los ovarios de embriones de pollo de 8 a 18 días de incubación (Woods et al., 1981; Teng y Teng 1982).

El uso de gradientes de densidad ha sido utilizado con éxito para la separación de las células esteroideogénicas del ovario del embrión de pollo (Teng y Teng 1979) y en pollos recién nacidos (Pedernera et al. 1988). Con esta técnica es posible separar dos poblaciones celulares que participan en la esteroideogénesis, una constituida por células esteroideogénicas típicas que secretan testosterona y otra formada por células epiteliales poco diferenciadas que secretan estradiol.

Sin embargo, el estudio del metabolismo de las hormonas esteroides bajo la influencia de gonadotropinas no ha sido reportado. Por lo anterior en el presente trabajo de investigación se evaluó la capacidad de las gonadotropinas de

inducir cambios en las enzimas involucradas en el metabolismo de los esteroides.

#### **OBJETIVO GENERAL**

Comprender los mecanismos de regulación por gonadotropinas (FSH y LH) de la vía esteroidogénica en embriones de pollo.

#### **OBJETIVO PARTICULAR**

Estudiar en un cultivo primario las vías esteroidogénicas para la síntesis de progestinas, andrógenos y estrógenos bajo la influencia de la Hormona Folículo Estimulante humana (hFSH) y la Gonadotropina Corionica Humana (hCG), en células ováricas de embriones de pollo de 18 días.

## MATERIAL Y METODOS

### REACTIVOS:

Se utilizó medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y tripsina obtenidos de GIBCO; el inhibidor de tripsina, la albúmina sérica bovina (BSA), la 1-metil-3-isobutil xantina (MIX) y la gonadotropina coriónica humana (hCG), fueron adquiridas de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO). Los siguientes esteroides: 3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona = pregnenolona (P5), 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-5-pregnen-20-ona = 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona (17OHP5), 4-pregnen-3,20-diona = progesterona (P4), 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona = 17 $\alpha$ -hidroxiprogesteroona (17OHP4), 20 $\alpha$ -hidroxiprogesteroona (20OHP4), 4-androsten-3,17-diona = androstendiona (A4), 3 $\beta$ -hidroxi-5-androsten-17-ona = dehidroepiandrosterona (DHEA), 17 $\beta$ -hidroxi-4-androsten-3-ona = testosterona (T), 1,3,5(10)-estratrien-3-ol-17-ona = estrona (E1), 1,3,5(10)-estratrien-3,17 $\beta$ -diol = 17 $\beta$ -estradiol (E2), 5 $\alpha$ -androstan-3,17-diona = 5 $\alpha$ -androstandiona (5 $\alpha$  diona), 5 $\beta$ -androstan-3,17-diona = 5 $\beta$ -androstandiona (5 $\beta$  diona) 5-pregnan-20 $\alpha$ -diona = 5 $\beta$ -pregnandiona (5 $\beta$ -pregnan), 5 $\beta$ -pregnan-3-20-diol = 5 $\beta$ -pregnandiol (5 $\beta$ -pregdiol), se obtuvieron de Steraloids (Wilton, NH).

La cromatografía de placa fina se realizó en cromatofolios de aluminio de sílica gel G-60 con indicador fluorescente F<sub>254</sub> (Merck, México). La purificación de los precursores tritiados se efectuó en cromatoplasmas de vidrio de sílica gel 60 sin indicador fluorescente.

Las membranas de policarbonato con poros de 1.0  $\mu$ m y 1.3 mm de diámetro se obtuvieron de Costar (Cambridge, MA).

Los precursores radioactivos utilizados fueron: [7 -  $^3\text{H}(\text{N})$ ]-pregnenolona con una actividad específica de 23.5 Ci/mmol ( $\text{P}_5^3\text{H}$ ), [1,2,6,7 -  $^3\text{H}(\text{N})$ ] - progesterona (94.1 Ci/mmol) ( $\text{P}_4^3\text{H}$ ), [1,2,6,7 -  $^3\text{H}(\text{N})$ ] - dehidroepiandrosterona (89.8 Ci/mmol) ( $\text{DHEA}^3\text{H}$ ), [1,2,6,7 -  $^3\text{H}(\text{N})$ ]-andros-4-ene-3,17-diona (93 Ci/mmol) ( $\text{A}_4^3\text{H}$ ), [1,2,6,7 -  $^3\text{H}(\text{N})$ ]-testosterona (105 Ci/mmol) ( $\text{T}^3\text{H}$ ), obtenidas de Du Pont Co. NEN Research Products (Boston, M.A.)

#### **ANIMALES :**

Se usaron embriones de pollo de 10 y 18 días de incubación de la raza Leghorn blanca. El huevo fértil fue obtenido de ALPES-II (Tehuacan, Puebla). Los embriones fueron decapitados para diseccionarles el ovario.

#### **OBTENCION DE LAS CELULAS**

Los ovarios del embrión de pollo son recibidos en una solución amortiguadora de fosfatos libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS) donde se les quitan las adherencias de tejido conectivo.

La disociación enzimática del ovario se realizó con tripsina al 0.25% diluida en la solución salina balanceada (PBS), a  $37^\circ\text{C}$ , en un baño con agitación (90 ciclos/min), durante 10 min. La acción de esta enzima se detiene lavando dos veces las células con inhibidor de tripsina al 0.50% disuelto en DMEN con 0.1% de BSA y centrifugando a 800 rpm durante 10 min.

El control de la viabilidad de las células se realizó con la prueba de exclusión de azul de tripano, el cual mostró un 95% de viabilidad después de la digestión celular (Tennant 1964).

A continuación se incuban alícuotas de  $5 \times 10^5$  células de la suspensión celular sobre membranas de policarbonato, en 1 ml de

medio de incubación Dulbecco bajo una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, durante 60 h. Se estudiaron tres grupos experimentales; uno tratado con hFSH (0.5UI/ml); rhFSH (0.5UI/ml); otro con hCG (0.5 UI/ml) y un testigo.

Posteriormente se les cambia el medio y las células son desprendidas de la membrana por acción mecánica para ser nuevamente incubadas alícuotas de  $5 \times 10^5$  en Dulbecco con albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1%, metil-isobutil-xantina (MIX) al 0.1 mM en presencia de 0.1 µCi de los diferentes precursores tritiados durante 15 min.

La incubación se realizó en un baño con agitación (90 ciclos/min) a 37 °C bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% Y 95% de aire, durante 15 min.

Una vez terminado el tiempo de incubación, ésta se detiene con 10 ml de éter etílico frío, La extracción de los esteroides de la fase acuosa (medio de cultivo y células) a la fase orgánica (éter) se realiza agitando con vortex por 25 seg. las fases, se congelan las muestras a -45 °C (fase acuosa) vertiendo la fase orgánica en otro vial y evaporando a sequedad a 40 °C. Se realizan un total de 3 extracciones de los esteroides con el éter etílico, metodo descrito por Juárez-Oropeza y col 1993.

En otra serie de experimentos las células ováricas fueron incubadas durante 60 h bajo las condiciones descritas arriba, fueron homogenizadas en un buffer de sacarosa isotónico y la fracción de mitocondrias obtenido por centrifugación diferencial. Las mitocondrias obtenidas fueron incubadas en 1 ml de medio de sacarosa al 0.2M, 20 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, con albúmina libre de ácidos grasos 1 mg/ml y 10 mM de isocitrato a un pH 7.4, durante 20 min a 37 °C (Toaff et al. 1983). Terminado el tiempo de la incubación se le adicionaron 1 ml de NaOH 0.3 N. La



pregnenolona fué extraída y cuantificada por radioinmunoanálisis (RIA) y el resultado expresado en pg/mg de proteína mitocondrial. La cuantificación de proteínas fue por el método de Lowry et al. 1951.

La sensibilidad del RIA es de 10-100 pg, el anticuerpo antipregnenolona utilizado posee una gran especificidad para pregnenolona del 100%, la reacción cruzada para P4, DHEA, A4, T, E2 y E1 es <0.03%

### **SEPARACION E IDENTIFICACION DE LOS METABOLITOS**

Se utilizaron placas de aluminio con silica Gel de 20 X 20 cm para analizar las muestras. La cromatografía se realizó sembrando los estándares de los esteroides auténticos como acarreadores y para referencia (aprox 10 µg) y las muestras problema en las placas de aluminio, las cuales se desarrollaron utilizando el sistema de solventes diclorometano:acetato de etilo 8:2 v/v.

Los esteroides usados como acarreadores y referencias (estándares auténticos) fueron: progesterona, 17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona, 20 $\alpha$ -hidroxiprogesteronona, androsterona, estrona, androstenediona, dehidroepiandrosterona, testosterona, 17 $\beta$ -estradiol, 5 $\alpha$ -androstandiona, 5 $\beta$ -androstandiona, 5 $\beta$ -pregnandiona, y 5 $\beta$ -pregnandioli.

Después de desarrollar la cromatografía, los estándares se revelaron con luz ultravioleta y con ácido sulfúrico al 10% y calentando a 120 °C.

De acuerdo con la localización del área cromatográfica de las muestras problema se dividió en zonas que corresponden a cada

estándar auténtico, se cortaron y depositaron en viales a los que se les agregó 5 ml de líquido de centelleo para ser leídos posteriormente en el contador de centelleo líquido (Beckman LS 6000).

Una vez obtenida la lectura de las cuentas por minuto (cpm), se calculó el porcentaje de transformación de los metabolitos identificados. El porcentaje de recuperación de la radioactividad fué en promedio de 90%.

### **RECRISTALIZACIÓN**

Para corroborar la identificación de los principales metabolitos obtenidos se recrystalizaron las muestras de la siguiente manera.

En tubos de vidrio previamente pesados, se les agregó de 15 a 30 mg del estándar correspondiente al metabolito que se pretendía verificar; se disolvió cada esteroide con etanol calentando y agitando en vórtex, la muestra problema se resuspendió en etanol y se tomo una alícuota que contuviera aproximadamente 100 000 cpm, que se les adiciono a los estándares fríos, se dio vórtex y agregamos agua helada.

Guardamos las muestras en refrigeración 24h para facilitar la cristalización de los esteroides. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 min para separar el medio líquido (aguas madres) de los cristales.

A las aguas madres se les midió el volumen y se cuantificó la cantidad de radioactividad. Los cristales se secaron en una estufa a 80°C durante 24h, se pesaron para calcular la recuperación y se disuelven nuevamente en etanol, se tomaron alícuotas para medir la radioactividad. Las recrystalizaciones

se repitieron 4 veces para cada uno de los estándares (Tabla 8).

#### **ANALISIS ESTADISTICO**

Los resultados se evaluaron estadísticamente con el análisis de varianza ANOVA y la prueba de Duncan. La significancia estadística fue establecida con una  $P < 0.05$  en la prueba.

## RESULTADOS

### METABOLISMO DE PREGNENOLONA

Las células del ovario izquierdo de embriones de pollo de 18 días, al ser incubadas en presencia de pregnenolona tritiada como sustrato durante 15 min, produjeron en diferentes porcentajes los siguientes metabolitos:  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona (17OHP5),  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona (17OHP4), progesterona (P4), androstendiona (A4) y  $5\beta$ -pregnandiona ( $5\beta$ -preg) (Cuadro 1).

El metabolito encontrado en mayor proporción es A4, este fue incrementado con la hormona folículo estimulante (FSH), obteniendo los siguientes porcentajes de transformación: basal 3.4%, hFSH 14.1%, rhFSH 17.4% y hCG 3.01%, la acumulación de este metabolito fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ), en los grupos estimulados con FSH.

La biotransformación a progesterona se mantiene con un porcentaje promedio de transformación de 3.1% en los grupos estudiados y no presentan cambios significativos entre ellos.

De los esteroides reducidos a partir de pregnenolona en el ovario de pollo de 18 días, encontramos  $5\beta$ -pregnandiona usando el sistema de diclorometano: acetato de etilo. El porcentaje de transformación de los grupos analizados fue: basal 3.0%, hFSH 11.6%, hFSHr 6.7% y hCG 1.5% presentando diferencias significativas en los grupos tratados con FSH (Cuadro 1).

Los otros metabolitos, que también son detectados a partir de P5 son: 17OHP5 y 17OHP4 con un porcentaje promedio de 13.2% y 3.2% de transformación respectivamente, y no presentan cambios significativos (Cuadro 1).

**Cuadro 1**

Efecto de las gonadotropinas sobre el metabolismo de **pregnenolona** en las células de ovario de embriones de pollo de 18 días, mantenidas en cultivo primario durante 60 h.

SUSTRATO/ metabolitos	Porcentaje de transformación de los grupos tratados			
	Basal	hFSH	hFSHr	hCG
<b>PREGNENOLONA</b>				
P4	4.2±2.8 <sup>a</sup>	3.5±2.5 <sup>a</sup>	4.2±3.8 <sup>a</sup>	0.5±0.6 <sup>a</sup>
17OHP4	3.3±3.9 <sup>a</sup>	3.8±2.6 <sup>a</sup>	3.0±3.4 <sup>a</sup>	2.6±2.9 <sup>a</sup>
A4	3.4±1.2 <sup>a</sup>	14.1±7.0 <sup>b</sup>	17.4±7.3 <sup>b</sup>	3.01±1.4 <sup>a</sup>
17OHP5	16.3±3.5 <sup>a</sup>	10.9±6.1 <sup>a</sup>	10.0±5.1 <sup>a</sup>	15.4±1.7 <sup>a</sup>
5β-preg	3.0±1.5 <sup>a</sup>	11.6±3.7 <sup>b</sup>	6.7±1.1 <sup>b</sup>	1.5±0.7 <sup>a</sup>
Reman.	53.7±8.5	37.8±5.1	43.6±9.6	64.1±2.6

Los valores indican el porcentaje de transformación (media ± DE) de una n=2 y por triplicado.

La comparación estadística se realizó entre columnas para un mismo metabolito.

Los grupos con distintos superíndices difieren significativamente (P < 0.05).

## **METABOLISMO DE PROGESTERONA**

Cuando usamos progesterona tritiada como sustrato durante 15 min de incubación las células del ovario izquierdo del embrión de pollo de 18 días produjeron los siguientes metabolitos:  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona, androstendiona,  $5\beta$ -pregnandiona y un metabolito no identificado con  $R_f = 0.32$  en nuestro sistema de solventes diclorometano: acetato de etilo 8:2 v/v.

La biotransformación hacia  $A_4$  se mantiene constante en los grupos estudiados y no presentan cambios con el tratamiento de las gonadotropinas con respecto al basal (Cuadro 2).

El mayor porcentaje de transformación al incubar con progesterona el ovario de 18 días, fue la  $5\beta$ -pregnandiona un esteroide reducido, con los siguientes porcentajes de biotransformación: basal 47.8%, hFSH 53.5%, hFSHr 48.1% y hCG 42.8%; la acumulación de este metabolito se mantiene en los grupos estudiados, no presentando diferencias entre los grupos tratados y el basal (Cuadro 2).

Otro metabolito, que también es detectado a partir de la incubación con  $P_4$ , es  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona, con un porcentaje promedio de 4.4% en los grupos estudiados.

El metabolito no identificado (Ni) tuvo un porcentaje de transformación promedio de 16.9% y un  $R_f = 0.32$  en nuestro sistema de solventes (Cuadro 2).

## **METABOLISMO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA**

En otra serie de experimentos en la que utilizamos DHEA tritiada como sustrato en embriones de 18 días, bajo las mismas condiciones descritas basal y estimuladas con hFSH y hCG, observamos que el porcentaje de biotransformación hacia  $A_4$  es incrementado tanto con la hFSH como con la hFSHr

## Cuadro 2

Efecto de las gonadotropinas sobre el metabolismo de **progesterona** en las células de ovario de embriones de pollo de 18 días, mantenidas en cultivo primario durante 60 h.

SUSTRATO/ metabolitos	Porcentaje de transformación de los grupos tratados			
	Basal	hFSH	hFSHr	hCG
<b>PROGESTERONA</b>				
17OHP4	4.8±2.3 <sup>a</sup>	4.4±0.8 <sup>a</sup>	4.5±0.7 <sup>a</sup>	4.2±1.2 <sup>a</sup>
A4	3.3±0.6 <sup>a</sup>	3.7±0.9 <sup>a</sup>	4.3±1.2 <sup>a</sup>	4.2±0.7 <sup>a</sup>
5β-preg	47.8±4.5 <sup>a</sup>	53.5±4.2 <sup>a</sup>	48.1±6.9 <sup>a</sup>	42.8±5.4 <sup>a</sup>
Ni (Rf 0.32)	17.8±5.9 <sup>a</sup>	12.7±5.2 <sup>a</sup>	15.5±5.9 <sup>a</sup>	21.6±8.1 <sup>a</sup>
Reman.	12.1±4.5	13.6±8.3	6.6±5.1	16.1±10.6

Los valores indican el porcentaje de transformación (media ± DE) de una n=4 por duplicado

Ni: no identificado

La comparación estadística se realizó entre columnas para un mismo metabolito.

Los grupos con distintos superíndices difieren significativamente (P < 0.05).

Mostrando los siguientes porcentaje de transformación: basal 7.4%, hFSH 16.5%, hFSHr 17.9% y hCG 9.4% (Tabla 3 y Fig. 9).

La estrona, también es detectada a partir de DHEA y el mayor porcentaje lo tenemos en los grupos tratados con FSH, con los siguientes porcentajes de conversión: basal 1.9%, hFSH 10.1%, hFSHr 10.9 %, hCG 2.8%.

La biotransformación a 5 $\beta$ -androstendiona es similar en los grupos estudiados (5.4%) no presentando cambios significativos entre ellos (Cuadro 3).

#### **METABOLISMO DE ANDROSTENEDIONA**

Las células del ovario izquierdo de embriones de pollo de 18 días, al ser incubadas en presencia de androstenediona tritiada como sustrato durante 15 min, produjeron en diferentes porcentajes los siguientes metabolitos; estrona (E<sub>1</sub>), 5 $\beta$ -androstendiona (5 $\beta$ -diona), testosterona (T) y tres metabolitos no identificados (Cuadro 4).

La biotransformación a estrona es incrementada por la hormona folículo estimulante, obteniendo los siguientes porcentajes de transformación; grupo basal 7.8%, hFSH 18.9%, hFSHr 21.0% y hCG 11.8% presentando cambios significativos P <0.05 los grupos tratados con FSH con relación a los otros grupos.

El mayor porcentaje de transformación del ovario de 18 días, a partir de A4 lo encontramos en el esteroide reducido, 5 $\beta$ -androstendiona, con los siguientes porcentajes de biotransformación; basal 17.1%, hFSH 15.6%, hFSHr 20.6%, hCG 21.5% no presenta diferencias significativas entre los grupos tratados y basales (Cuadro 4).



**Cuadro 3**

Efecto de las gonadotropinas sobre el metabolismo de **dehidroepiandrosterona** en las células de ovario de embriones de pollo de 18 días, mantenidas en cultivo primario durante 60 h.

<b>SUSTRATO/ metabolitos</b>	Porcentaje de transformación de los grupos tratados			
	Basal	hFSH	hFSHr	hCG
<b>DEHIDROEPI- ANDROSTERONA</b>				
A4	7.4±3.8 <sup>a</sup>	16.5±3.6 <sup>b</sup>	17.9±5.7 <sup>b</sup>	9.4±5.2 <sup>ab</sup>
E1	1.9±1.6 <sup>a</sup>	10.1±7.5 <sup>b</sup>	10.9±8.0 <sup>b</sup>	2.8±2.2 <sup>a</sup>
5β-diona	3.2±1.8 <sup>a</sup>	7.5±3.9 <sup>a</sup>	7.0±3.1 <sup>a</sup>	3.1±1.3 <sup>a</sup>
Reman.	63.3±14.7	40.0±13.1	48.1±15.7	67.2±12.9

Los valores indican el porcentaje de transformación (media ± DE) de una n=6 duplicado.

Los grupos con distintos superíndices difieren significativamente (P < 0.05).

La comparación estadística se realizó entre columnas para un mismo metabolito

Otro metabolito, que también es detectado a partir de A<sub>4</sub> es testosterona con una biotransformación de 4.2% en los diferentes grupos estudiados.

Tres metabolitos no identificados son producidos a partir de A<sub>4</sub>, con una transformación promedio; de 14.7% y un R<sub>f</sub> = 0.35 del primero (Ni1), 11.5% y un R<sub>f</sub> = 0.03 para el segundo (Ni2) y 4.3% de transformación, con un R<sub>f</sub> = 0.16 en el tercero (Ni3) en nuestro sistema de solventes. Estos metabolitos tienen un porcentaje de transformación similar en todos los grupos estudiados y no presentan cambios significativos (Cuadr 4).

En otra serie de experimentos las células de los testículos, las del ovario izquierdo y del ovario derecho de embriones de pollo de 10 días de incubación, al ser incubadas en presencia de androstenediona tritiada como sustrato durante 15 min, en condiciones basales y estimuladas con hFSH, produjeron en diferentes porcentajes los siguientes metabolitos; estrona (E1), 5β-androstendiona (5β-diona), testosterona (T) y tres metabolitos no identificados (Cuadro 5).

La transformación a estrona en los ovarios derecho e izquierdo es incrementada por la hormona folículo estimulante, obteniendo los siguientes porcentajes de transformación; grupo basal 10.0%, hFSH 15%, en ambos ovarios, presentando cambios significativos (P< 0.05) los grupos tratados con FSH, en cambio en el testículo la producción de estrógenos es baja, 0.5% de transformación (Cuadro 5).

La biotransformación a 5β-androstandiona en el ovario izquierdo es de 25.9%, en el ovario derecho 16.8% y en el testículo 34.1% en promedio, no presentando cambios significativos en las condiciones estudiadas (Cuadro 5).

**Cuadro 4**

Efecto de las gonadotropinas sobre el metabolismo de **androstenediona** en las células del ovario de embriones de pollo de 18 días, mantenidas en cultivo primario durante 60 hr.

SUSTRATO/ metabolitos	Porcentaje de transformación de los grupos tratados			
	Basal	hFSH	hFSHr	hCG
<b>ANDROSTENE- DIONA</b>				
E1	7.8±2.3 <sup>a</sup>	18.9±5.5 <sup>b</sup>	21.0±5.6 <sup>b</sup>	11.8±3.3 <sup>a</sup>
T	7.2±6.1 <sup>a</sup>	2.8±1.9 <sup>a</sup>	3.0±2.2 <sup>a</sup>	3.7±2.6 <sup>a</sup>
5β-diona	17.1±7.4 <sup>a</sup>	15.6±7.7 <sup>a</sup>	20.6±8.1 <sup>a</sup>	21.5±5.8 <sup>a</sup>
Ni1 (Rf0.35)	19.9±9.7 <sup>a</sup>	13.3±3.5 <sup>a</sup>	9.9±4.3 <sup>a</sup>	15.6±8.8 <sup>a</sup>
Ni2 (Rf0.16)	3.9±1.0 <sup>a</sup>	4.6±2.9 <sup>a</sup>	5.0±6.6 <sup>a</sup>	3.7±0.7 <sup>a</sup>
Ni3 (Rf0.03)	10.8±2.6 <sup>a</sup>	14.0±5.1 <sup>a</sup>	11.4±5.9 <sup>a</sup>	9.8±1.8 <sup>a</sup>
Reman.	15.0±1.8	14.3±3.2	15.9±1.6	16.5±2.3

Los valores indican el porcentaje de transformación (media ± DE) de una n=5 por duplicado

Ni: no identificado

La comparación estadística se realizó entre columnas para un mismo metabolito

Los grupos con distintos superíndices difieren significativamente (P < 0.05).

Otro metabolito, que también es detectado en los ovarios de embriones de 10 días a partir de A<sub>4</sub> es la testosterona con una biotransformación de 0.7%; en los testículos el porcentaje de transformación es de 2.95%.

A partir de A<sub>4</sub>, tres metabolitos no identificados son producidos, con una transformación promedio de 9.3% y un R<sub>f</sub>= 0.35 para el primer metabolito, 4.75% y un R<sub>f</sub>= 0.03 del segundo metabolito, 3.7% y un R<sub>f</sub>=0.03 en el tercero en nuestro sistema de solventes. Estos metabolitos tienen un porcentaje de transformación similar en todos los grupos estudiados y no presentan cambios significativos (Cuadro 5).

#### **METABOLISMO DE TESTOSTERONA**

En otra serie de experimentos en la que también utilizamos embriones de 18 días de incubación y testosterona tritiada como sustrato en las mismas condiciones descritas basal y estimulada con hFSH y LH, observamos que el porcentaje de transformación a A<sub>4</sub> no se modifica con estas gonadotropinas: basal 5.9%, hFSH 8.3%, hFSHr 8.2%, LH 7.7% (Cuadro 6)

La biotransformación a 5β-androstendiona es similar en los grupos tratados; este metabolito reducido tiene un promedio de transformación de 3.3% durante los 15 min de incubación.

La transformación a estrona no es incrementada por las gonadotropinas, teniendo los siguientes porcentajes de transformación: grupo basal 0.9%, hFSH 3.1%, hFSHr 2.3%, hCG 1.4% (Cuadro 6).

**Cuadro 5**

Efecto de las gonadotropinas sobre el metabolismo de **androstenediona** en las células de ovario y testículo de embriones de pollo de 10 días, mantenidas en cultivo primario durante 60 h.

	Porcentaje de transformación de los grupos tratados					
	Ovario izq		ovario der		testículo	
	Basal	hFSH	Basal	hFSH	Basal	hFSH
<b>SUSTRATO/ metabolitos</b>						
<b>ANDROSTENE- DIONA</b>						
E1	10.0±2.2 <sup>a</sup>	15.0±0.9 <sup>b</sup>	10.2±2.6 <sup>a</sup>	15.2±2.2 <sup>b</sup>	0.5±0.1 <sup>a</sup>	0.5±0.2 <sup>a</sup>
5β-diona	24.1±9.3 <sup>ab</sup>	27.8±12.7 <sup>ab</sup>	16.9±6.9 <sup>a</sup>	16.8±7.1 <sup>a</sup>	33.1±4 <sup>b</sup>	35.1±4 <sup>b</sup>
T	0.7±0.6 <sup>a</sup>	0.7±0.8 <sup>a</sup>	0.7±0.9 <sup>a</sup>	0.8±0.7 <sup>a</sup>	2.6±1.2 <sup>a</sup>	3.3±2 <sup>a</sup>
Ni(0.35)	17.8±5.1 <sup>a</sup>	6.9±2.1 <sup>b</sup>	5.1±3.1 <sup>b</sup>	7.5±1.8 <sup>b</sup>	ND	ND
Ni(0.16)	4.5±0.8 <sup>a</sup>	4.4±1.3 <sup>a</sup>	1.8±0.9 <sup>a</sup>	3.9±1.6 <sup>a</sup>	ND	ND
Ni(0.03)	5.3±3.0 <sup>a</sup>	5.6±3.8 <sup>a</sup>	2.0±1.5 <sup>a</sup>	6.1±3.7 <sup>a</sup>	ND	ND
Reman.	16.0±2.3	18.1±3.7	35.0±9.9	28.4±7.9	49.4±8.5	47.3±14

Los valores indican el porcentaje de transformación (media ± DE) de una n=6 por duplicado

ND: no detectado y Ni: no identificado

La comparación estadística se realizó entre columnas para un mismo metabolito

Los grupos con distintos superíndices difieren significativamente (P < 0.05).

**Cuadro 6**

Efecto de las gonadotropinas sobre el metabolismo de **testosterona** en las células de ovario de embriones de pollo de 18 días, mantenidas en cultivo primario durante 60 hr.

SUSTRATO/ metabolitos	Porcentaje de transformación de los grupos tratados			
	Basal	hFSH	hFSHr	hCG
<b>TESTOSTERONA</b>				
A4	5.9±1.5 <sup>a</sup>	8.3±2.3 <sup>a</sup>	8.2±2.5 <sup>a</sup>	7.7±2.
E1	0.9±0.6 <sup>a</sup>	3.1±1.6 <sup>a</sup>	2.3±0.8 <sup>a</sup>	1.4±1.0 <sup>a</sup>
5β-diona	2.4±0.8 <sup>a</sup>	3.9±1.8 <sup>a</sup>	3.2±1.0 <sup>a</sup>	3.6±0.9 <sup>a</sup>
Nil (Rf0.35)	2.6±1.1 <sup>a</sup>	5.3±2.4 <sup>a</sup>	4.0±1.9 <sup>a</sup>	2.3±2.2 <sup>a</sup>
Reman.	72.9±2.5	66.5±6.3	67.4±5.2	71.5±4.2

Los valores indican el porcentaje de transformación (media ± DE) de una n=4 por duplicado

La comparación estadística se realizó entre columnas para un mismo metabolito

Los grupos con distintos superíndices difieren significativamente (P < 0.05).

### SINTESIS DE PREGNENOLONA

Para la síntesis de pregnenolona las células del ovario izquierdo de embriones de pollo de 18 días, fueron incubadas con hFSH (0.5UI/ml) y hCG (0.5UI/ml) durante 60 h, después de las cuales fueron homogenizadas en un buffer de sacarosa y la fracción mitocondrial obtenida por centrifugación diferencial. Las mitocondrias obtenidas fueron incubadas en un medio de sacarosa con albúmina libre de ácidos grasos, durante 20 min a 37°C. La pregnenolona fue extraída y cuantificada por radioinmunoanálisis (RIA) y el resultado expresado en pg/mg de proteína mitocondrial.

La síntesis de pregnenolona de las mitocondrias de las células del ovario de pollo de 18 días de incubación, fue incrementada significativamente por ambas gonadotropinas hFSH y hCG (Cuadro 7).

#### Cuadro 7

Efecto del tratamiento de FSH y hCG en la **síntesis de pregnenolona** en las mitocondrias de las células ováricas de embriones de pollo de 18 días

---

	Síntesis de esteroides pg/mg de proteína		
	Basal	FSH	hCG
<b>Pregnenolone</b>	0.257± 0.055 <sup>a</sup>	0.583±0.018 <sup>b</sup>	0.803±0.309 <sup>b</sup>

---

Los valores indican la media ± DE de una n=3 por duplicado en cada grupo. Los grupos con distintos superíndices difieren significativamente (P < 0.05).

En una serie de experimento las células del ovario izquierdo de embriones de pollo de 18 días fueron incubadas con esteroides tritiados para la corroboración de la identificación de los principales metabolitos. Esta identificación fue por la actividad específica de los cristales después de repetidas cristalizaciones de el metabolito radioactivo y el estándar autentico (Cuadro 8).

**Cuadro 8**

**Actividad específica** obtenida en los cristales del estándar auténtico formados en presencia del metabolito tritiado en alícuotas de extracto de células del ovario del pollo.

	<b>Recristalizaciones sucesivas</b>			
	<b>(cpm/mg)</b>			
	C1	C2	C3	C4
Androstenediona	1621.1	1618.4	1480.5	1540.4
Estrona	269.8	102.0	90.9	90.6
17 $\beta$ -estradiol	445.5	299.6	117.8	69.4
5 $\beta$ -androstendione	927.8	930.2	927.9	924.0
5 $\beta$ -pregnandiona	1741.0	1515.9	1107.1	1011.0

C, cristales; solvente utilizado etanol: agua 1:1 (v/v)



## DISCUSIÓN

La acción biológica de LH Y FSH en el tejido gonadal es mediado por los receptores FSH (FSHR) y LH (LHR). La secuenciación de cDNA de los receptores FSHR y LHR de pollo han sido estudiados por varios grupos científicos elucidando: (i) el papel de las gonadotropinas en la diferenciación gonadal, (ii) el establecimiento del eje hipotálamo-hipofisis-gonada (HPG) en el embrión de pollos. Akasome et al. 2002 demostro la extresion RNAm gonadal del los receptores FSHR y LHR en embriones de ambos sexos de 4 días de incubación. La cantidad de RNAm de los receptores fue mayor en los embriones femeninos que en los machos al 6 día de incubación, cuando la diferenciación sexual ha sido iniciada.

En el presente trabajo estudiamos el metabolismo de las hormonas esteroides en condiciones basales y con gonadotropinas (FSH y LH) en las células del ovario del embrión de pollo de 10 y 18 días. Al sembrar Las células en una membrana de policarbonato en alta densidad, estas células se organizan en múltiples capas como un órgano en cultivo (Velázquez et al. 1997).

Transcurrido el tiempo de incubación fueron nuevamente incubadas en presencia de los diferentes precursores tritiados usados como sustrato durante 15 min. La transformación de los metabolitos producidos fue la evidencia indirecta de las actividades enzimáticas.

### **Síntesis de pregnenolona**

En la biosíntesis de hormonas esteroides intervienen tres miembros de la superfamilia de enzimas llamados citocromos

P450 (CYPs). El primer paso de la esteroidogénesis es la conversión del colesterol a pregnenolona esta reacción es catalizada por el citocromo P450scc, la transformación de progestagenos a andrógenos la realiza el citocromo P450c17 y la biosíntesis de estrógenos a partir de andrógenos es catalizada por el citocromo P450arom. (Payne y Hales 2004; Hu et al 2010).

El primer paso en la síntesis de esteroides es la conversión de pregnenolona a partir del colesterol, el colesterol es transportado a la membrana interna de la mitocondria donde la acción del liasas e hidroxilasas desdoblan y oxidan la cadena lateral (citocromo P450scc) originando la pregnenolona (Liu y Papadopoulos 2006; Hu et al. 2010).

En nuestro laboratorio realizamos estudios de la síntesis de pregnenolona en las mitocondrias de las células ováricas de embriones de pollo de 18 días en condiciones basales y con FSH/hCG. Las mitocondrias fueron obtenidas por homogenización del ovario en buffer de sacarosa y por centrifugación diferencial. La pregnenolona fue medida con radioinmunoanálisis (RIA). Encontramos que la síntesis de pregnenolona aumenta significativamente con FSH y hCG.

En este modelo *in vitro* las gonadotropinas hFSH y hCG modulan la actividad del citocromo P450scc.

Nuestros datos coinciden con estudios similares hechos en células de la granulosa de folículos de 6-8 mm del ovario de gallina en el que FSH y hCG incrementa la actividad del citocromo P450scc (Li y Johnson 1993a). Así como lo reportado en células de mamíferos en donde estudian el efecto de la FSH en las células de la granulosa de ovario de cerdo y rata, observando el aumento de la actividad de P450scc (Veldhuis y Rogers, 1987; Trzeciak et al. 1986).

El citocromo P450scc ha sido inmunolocalizado en el folículo y en el cuerpo lúteo de varias especies; en los humanos (Sasano et al. 1989), en ovinos (Rodgers et al. 1988) y en las células intersticiales del ovario de ratas inmaduras (Le Goascone et al. 1995). Estudios con microscopía electrónica e inmunocitoquímica lo han detectado a nivel subcelular este citocromo P450scc, en la cresta interna de las mitocondrias de las células de la teca interna del folículo en el ovario, en el cuerpo lúteo y la zona fascicular de la corteza adrenal de la rata (Ishimura y Fujita 1997; Pelletier et al. 2001).

La hCG y la gonadotropina coriónica equina (eCG) incrementan la expresión de P450scc en el ovario de ratas cuando se administra *in vivo* (Doody et al. 2001).

Los estudios de inmunocitoquímica y la presencia de RNAm del citocromo P450scc, nos indican que la enzima esta presente en los tejidos, pero no dice, si la enzima esta activa, por lo que la actividad de la enzima la detectamos al hacer el estudio de la síntesis de pregnenolona en las mitocondrias de las células ováricas del embrión de pollo de 18 días, nuestros datos demuestran la síntesis de pregnenolona (Cuadro 7) por las células ováricas y su incremento con FSH y hCG.

### **Metabolismo de pregnenolona y progesterona**

La hidroxilación de pregnenolona y la progesterona en la posición  $17\alpha$  y el corte del carbono C17,20 son catalizadas por la  $17\alpha$ -hidroxilasa/17,20 liasa (citocromo P450c17) que son transformadas a dehidroepiandrosterona y androstenediona respectivamente (Miller 2005).

Después de incubar las células del ovario de pollo con pregnenolona tritiada para el estudio del citocromo P450c17 *in vitro* observamos que hFSH y rhFSH estimulan la producción de androstenediona (Cuadro 1). Li y Johnson 1993b estudiaron mRNA del citocromo P450c17 en las células de la granulosa de los folículos del ovario de gallina, y observaron que decrece con la maduración del folículo y cuando es estimulada con rhFSH aumenta el mRNA y la producción de androstenediona.

Este citocromo ha sido inmunolocalizado en los folículos del ovario de gallina en las células de la teca interna y cuerpo lúteo (Nitta et al., 1991). Y en rata en el retículo endoplásmico de las células de la teca interna del ovario en la rata (Pelletier et al. 2001).

Por otra parte al incubar con progesterona el mayor porcentaje de transformación es un compuesto reducido 5 $\beta$ -pregnan-3-20 diona, la enzima implicada es la 5 $\beta$ -reductasa que no es modulada por las gonadotropinas (Cuadro 2). En 1989 Imataka y col. reporta la biotransformación de P4 a 5 $\beta$ -pregnan-3-20 diona como el principal metabolito producido y con el mayor porcentaje de transformación (20% ovario y 13% testículo) en embriones de pollo de 15 días, coincidiendo con nuestros resultados en la que la 5 $\beta$ -pregnan-3-20 diona (47%) es el principal metabolito producido a partir de progesterona en el ovario de embrión de pollo de 18 días y no aumenta con la FSH ni con la hCG lo que nos indica que no es regulada por las gonadotropinas (Cuadro 2).

Wiebe y col. 1990 también reporta la transformación de 5 $\beta$ -reductasa en las células de la granulosa de gallinas a partir

de progesterona. Esta enzima convierte la progesterona biológicamente activa en menos activa.

### **Metabolismo de dehidroepiandrosterona**

Esta enzima cataliza la conversión de los esteroides de la vía  $\Delta 5$  a la vía  $\Delta 4$ , es decir pregnenolona y dehidroepiandrosteron son transformadas en progesterona y androstenediona respectivamente (Simard et al. 2005; Hu et al 2010).

En este estudio evaluamos el metabolismo de pregnenolona en las células del ovario de pollo encontrando, que la mayor transformación es a androstenediona y esta aumenta significativamente con hFSH (Cuadro 1). Además estas células metabolizan tanto pregnenolona como progesterona en  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona y androstenediona lo que nos indica que tiene activa la vía  $\Delta 5$  así como la vía  $\Delta 4$  como reporta Nakamura en 1974 en gallinas adultas, pero hay una preferencia por la vía  $\Delta 4$  en los embriones de pollo.

Por otro lado la actividad de la enzima  $3\beta$ -HSD fue incrementada en las células del ovario del embrión de pollo cultivadas durante 60 h en presencia de hFSH y rhFSH con la producción de androstenediona a partir de dehidroepiandrosterona (Cuadro 3).

Las células esteroideogénicas del ovario del embrión de pollo han sido estudiadas ultraestructuralmente y por inmunohistoquímica, demostrando una actividad positiva a  $3\beta$ -HSD (Scheib y Haffen 1967).

Estudios hechos en gallina también han demostrado el efecto de FSH en las células de la granulosa (McElroy et al. 2004;

Robinson et al. 1988; Tilly et al. 1991a) y en células granulosas del ovario de mamífero (Zelevnik et al. 1974).

Esta enzima ha sido inmunolocalizada en el ovario humano y los niveles dependen del estado de desarrollo del folículo. En los folículos pequeños la  $3\beta$ -HSD ha sido inmunolocalizada en la teca interna, mientras que los folículos más grandes se detecta en las células de la granulosa y en la teca interna (Sasano 1990).

El tratamiento con hCG incrementa la actividad de la  $3\beta$ -HSD y los niveles de mRNA en las células de rata (Martel et al. 1990a) pero la FSH no tiene influencia (Martel et al. 1990b). Nuestros resultados no concuerdan con su efecto de hCG.

### **Metabolismo de androstenediona y testosterona**

La androstenediona y testosterona es transformada por el citocromo P450arom en estrona y  $17\beta$ -estradiol respectivamente. El ovario de 18 días de pollo metaboliza androstenediona en estrona y  $5\beta$ -androstenediona, la estrona es el metabolito que se encontró en mayor porcentaje, este paso está catalizado por la aromatasa la cual aumenta significativamente con hFSH y hFSHr (Cuadro 4).

En otra serie de experimentos en la que utilizamos ovarios y testículos de embriones de 10 días para el estudio de la aromatasa, tenemos que el % de transformación a estrona a partir de androstenediona, aumento significativamente tanto en el ovario derecho como en el izquierdo con hFSH (Cuadro 5). Estos datos nos muestran a la vez que el ovario derecho del embrión de pollo de 10 días está activo, la regresión de dicha gónada es en el día 12 de vida embrionaria, tendiendo a

convertirse en un ovario diminuto y rudimentario (Teng y Teng 1979).

En el testículo del embrión de pollo de 10 días hay transformación de estrona (0.5%) a partir de androstenediona, lo que nos demuestra que la actividad aromatasa es muy baja en el testículo embrionario. Por otra parte es de destacar que la FSH no estimula la aromatasa en el testículo del embrión de pollo de 10 días (Cuadro 5).

Estudios previos han demostrado que androstenediona es el mejor sustrato para el estudio de la aromatasa que testosterona en el ovario del embrión de pollo (Alvarez-Fernández et al. 1995).

Otros experimentos realizados con el ovario del embrión de pollo *in vivo* e *in vitro* con FSH, han demostrado que la FSH aumento significativamente la secreción de  $17\beta$ -estradiol (Teng y Teng 1982; Velázquez et al., 1997).

Pedernera y col en 1988 demostró que las células somáticas de los cordones medulares del ovario del embrión de pollo poseen la actividad del citocromo P450arom con la secreción de  $17\beta$ -estradiol.

El citocromo P450arom en la mujer ha sido inmunolocalizada en células de la granulosa y células lúteas (Sasano et al. 1989), esta tinción es mayor en los folículos más maduros.

### **5 $\beta$ -reductasa**

La actividad de  $5\beta$ -reductasa fue localizada en los testículos, el ovario izquierdo de 10 días y los ovarios de 18 días de los embriones de pollo con la producción de  $5\beta$ -androstenediona en cantidades significativas (30%), esta enzima no es modulada por las gonadotropinas (Cuadro 4 y 5).

La actividad de  $5\beta$ -reductasa fue confirmada por la acumulación de  $5\beta$ -pregnandiona cuando progesterona fue usado como sustrato (Cuadro 2).

Esta actividad enzimática ha sido reportada también en el ovario adulto de gallina (Marrone et al. 1985) y en las gónadas de pollo (Imataka et al. 1988a).

### **17 $\beta$ -HSD**

La 17 $\beta$ -HSD es la enzima responsable de la interconversión de androstenediona a testosterona y de estrona a estradiol, la presencia de la enzima ha sido demostrada en varias especies y tejidos pero la mayor actividad esta en el ovario y testículo.

En nuestra investigación al incubar las células del ovario y testículo de 10 días y el ovario de 18 días con androstenediona y ver su transformación a testosterona observamos que las gonadotropinas no modifican la actividad de a 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Cuadro 4 y 5). Pero al estudiar la conversión de testosterona a androstenediona observamos que el porcentaje de transformación en este sentido es un poco mayor que el de androstenediona a testosterona.



## CONCLUSIONES

La síntesis de pregnenolona aumenta significativamente con la estimulación de hFSH y hCG (citocromo P450<sub>scc</sub>).

La actividad del citocromo P450<sub>C17</sub> y de la enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa no son modulada por las gonadotropinas (hFSH y hCG).

La enzima 3 $\beta$ -HSD es modulada por hFSH, hFSHr con la producción de androstenediona a partir de dehidroepiandrosterona.

La actividad del citocromo P450<sub>arom</sub> está presente en las células de los ovarios de pollo de 10 y 18 días, cultivados en un medio definido durante 60 horas y es estimulado por la hFSH bajo las condiciones descritas.

La actividad de la enzima 5 $\beta$ -reductasa no es regulada por las gonadotropinas en cultivos de células de ovario de pollo de 10 y 18 días.

Entre las respuestas a FSH ultrapurificada (hFSH) y la FSH recombinante (hFSHr) no se observaron diferencias, indicando que ambas presentaciones están constituidas por la misma isoforma o que la respuesta a la FSH no depende de la presencia de distintas isoformas.

En los embriones de 10 días, el ovario derecho es esteroidogénicamente activo en la producción de estrona y 5 $\beta$ -androstenediona.

En el testículo de embriones de 10 días sólo se observa la producción de 5 $\beta$ -androstandiona que sugiere la presencia de la 5 $\beta$ -reductasa y no tiene actividad de P450aro.

## BIBLIOGRAFIA

- Allegrucci C, Thurston A, Lucas E, Young L (2005) Epigenetics and the germline. *Reproduction* 129:134-149
- Álvarez-Fernández G, Juárez-Oropeza MA, Velázquez P, González del Pliego M, Méndez-Herrera MC, Pedernera E (1995) Newly hatched chick ovarian cell subpopulations metabolize distinctively progesterin and androgen precursors. *Gen Comp Endocrinol* 97(1):31-41
- Akazome Y, Abe T, Mori T (2002) Differentiation of chicken gonad as an endocrine organ: expression of LH receptor, FSH receptor, cytochrome P450c17 and aromatase gene. *Reproduction* 123:721-728
- Andrews JS, Smith CA, Sinclair AH (1997) Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 60: 295-302
- Avvakumov GV, Cherkasov A, Muller YA, Hammond GL (2009) Structural analyses of sex hormone-binding globulin reveal novel ligands and function. *Mol Cell Endocrinol*. 316(1):13-23.
- Barske LA, Capel B (2010) An avian sexual revolution. *Nature* 464: 171-73
- Bottino MC, Lanari C (2010) Localización extra nuclear de receptores esteroides y activación de mecanismos no genómicos. *Medicina (Buenos Aires)* 70:173-184
- Bronwyn CM, Sinclair AH (2002) Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction* 124:194-207
- Bruggerman V, Van-As P, Decuypere E (2002) Developmental endocrinology of the reproductive axis in the chicken embryo. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 131:839-846
- Buehr M, Smith A (2003) Genesis of embryonic stem cells. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 358, 1397-1402
- Byskov A (1986) Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev* 66:71-117
- Capel B. (2009) Gonad Morphogenesis in Vertebrates: Somatic-Germ Cell Interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 25; 221-251

Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C, Crum CP (2009) The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage Proc Natl Acad Sci U S A. 97(17):9585-90.

Cedard L, Haffen K, Guichard A (1968) Influence de l' hormone gonadotrope chorionique sur la production d'oestrogenes à partir d'acetate de Na et de dehydroepiandrosterone radioactifs par les gonades embryonnaires, de poulet, cultivées in vitro. C R Acad Sci Paris 267 Serie D: 118-120

Chen YJ, Lee MT, Yao HC, Hsiao PW, Ke FC, Hwang JJ (2008) Crucial role of estrogen receptor- $\alpha$  interaction with transcription coregulators in Follicle-Stimulating Hormone and Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Up-Regulation of steroidogenesis in rat ovarian granulosa cells. Endocrinology Vol. 149, No. 9 4658-4668

Cheng CK, Leung PC. (2005) Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. Endocr Rev 26, 283-306.

Conley A, Hinshelwood M (2001) Mammalian aromatase. Reproduction 121: 685-695

Cortés V, Quezada N, Rigotti AM (2005) New heterodimeric nuclear receptors: key metabolic regulators with relevance in the pathophysiology and therapy of diabetes mellitus. Rev Med Chile 133:1483-1492

DeFalco T, Capel B (2009) Gonad Morphogenesis in Vertebrates: Divergent Means to a Convergent End. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 25:457-82

Díaz-Hernandez V, Merchan-Larios H (2008) Bases moleculares de la determinación sexual en mamíferos Ciencias naturales y Agropecuarias 15-3: 287-296

Doody KJ, Lephart ED, Stirling D, Lorence MC, Magness RR, McPhaul MJ, Simpson ER (2001) Expression of mRNA species encoding steroidogenic enzymes in the rat ovary. 6(2):153-62

Erickson GF, Shimasaki S (2001) The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. Fertil Steril 76(5):943-9

Galli FE, Wassermann GF (1973) Steroid biosynthesis by gonads of 7-and 10-day old chick embryos. Gen Comp Endocrinol 21:77-83

Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. (2006) Overview of nomenclature of nuclear receptors. Pharmacol 58 (4): 685-704.

Gilbert AB (1971b) The Endocrine ovary in reproduction. En "Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl" (J. Bell and Freeman, eds) Vol 3 Academic Press, London and New York 1449-1468

Gilbert SF (2005) Sex determination. En: Developmental Biology Seventh edition Sinauer Associates Inc 547-613

Gilbert SF (2005) The saga of the germ line. En: Developmental Biology. Seventh edition Sinauer Associates Inc 613-643

Gilbert SF (2005) The early development of vertebrates: Fish, birds and mammals. En: Developmental Biology Seventh edition. Sinauer Associates Inc 354-388

Gómez Y, Velázquez PN, Juárez-Oropeza MA, Pedernera E (1998) Steroid metabolism in granulosa and theca interna cells from preovulatory follicles of domestic hen (*Gallus domesticus*). Anim Reprod Sci 52(1):81-91

González-Morán G, González-del Pliego M, Pedernera E (1985) Morphological changes in the ovary of newly hatched chickens treated with chorionic gonadotropin during embryonic development. Gen Comp Endocrinol 59(1): 162-167

González del Pliego M, González Morán G, Pedernera E (1988) Ultrastructure of the ovarian medulla in the newly hatched chick treated with human chorionic gonadotropin. Cell Tissue Res 253: 665-670

Guichard A, Cedard L, Haffen K (1973) Aspect Comparatif de la synthèse de stéroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de poulet à différents stades du développement (étude en culture organotypique à partir de précurseurs radioactifs). Gen comp Endocrinol 20: 16-28

Guichard A, Cedard L, Mignot TM, Scheib D, Haffen K (1977a) Radioimmunoassay of steroid produced by cultured chick

embryonic gonads: Differences according to age, sex, and side. Gen Comp Endocrinol 322: 255-263

Guichard A, Scheib D, Haffen K, Cedard L (1977b) Radioimmunoassay of steroid hormones produced by embryonic chick gonads during organ culture. J Steroid Biochem 81:599-602.

Guichard A, Haffen K, Cedard L, Mignot TM, Scheib D (1979) Effects of hCG and of seasons on "in vitro" steroidogenesis by-day chick embryo gonads. Ann Biol Anim Biochem Biophys 19:1317-1325

Guitafson y Wessel (2010) VASA genes: emerging roles in the germ line and in multipotent cells. Bioessays 32: 626-637.

Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S.(2010) Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. Nutr Metab 1 (7); 47

Hudson QJ, Smith CA, Sinclair AH (2005) Aromatase inhibition reduces expression of FOXL2 in the embryonic chicken ovary. Develop Dynamics 233, 1052-1055

Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL (1994) Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. Molecular Endocrinology 8:654-662

Ikeda Y, Swain A, Weber TJ (1997) Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. Molecular Endocrinology 10:1261-1272

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

Ishimura K, Fujita H (1997) Light and electron microscopic immunohistochemistry of the localization of adrenal steroidogenesis enzymes. Microscopy Research and technique 36: 445-453

Jeyasuria P, Ikeda Y, Jamin SP, Zhao L, De Rooij DG, Themmen AP, Behringer RR, Parker KL. (2004) Cell-specific knockout of

steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Mol Endocrinol.* 18(7):1610-9.

Jordanov J, Angelova P, Boyadjieva-Michailova A, Bakalska M (1978) Ultrastructure of developing interstitial cells in chick embryonic gonad in relation to their genesis and steroidogenic function. *Z Mikrosk Anat Forsch* 92(3):449-64

Juárez-Oropeza MA, Alvarez-Fernández G, López V, Kawa S, Pedernera E. 1993 Steroid metabolism in the cortex and the medulla of the early fetal bovine ovary. *J Exp Zool.* 266(2):102-7

Kanai Y, Hiramatsu R, Matoba S, Kidokoro T (2005) From SRY to SOX9: Mammalian testis differentiation. *J Biochemical* 138: 13-19

Kanda I, Akazome Y, Ogasawara O, Mori T (2000) Expression of cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase during embryogenesis in chicken adrenal glands and gonads. *Gen Comp Endocrinol* 118(1):96-104

Knight PG, Glister C (2006) TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 132(2):191-206

Kobayashi A, Chang H, Chaboissier M-Ch, Sched, A, Behringer R (2005) Sox9 in Testis determination. *Ann N.Y. Sci* 1061: 9-17

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

Kousta E, Papathanasio A, Skordis N.(2010) Sex determination and disorders of sex development according to the revised nomenclature and classification in 46,XX individuals. *HORMONES* 9(3):218-231

Lalli E, Sassone-Corsi P (2003) DAX-1, an unusual orphan receptor at the crossroads of steroidogenic function and sexual differentiation. *Molecular Endocrinology* 17 (8): 1445-1453

Le Goascogne C, Sananes N, Eychenn, B, Guezou M, Baulieu EE, Robel P (1995) Androgen biosynthesis in the stomach: expression of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase

messenger ribonucleic acid and protein, and metabolism of pregnenolone and progesterone by parietal cells of the rat gastric mucosa. *Endocrinology* 136(4):1744-52

Lee VH, Lee LT, Chow BK. (2008) Gonadotropin-releasing hormone: regulation of the GnRH gene. *FEBS J.* 275(22):5458-78

Li Z, Johnson AL (1993b) Expression and regulation of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase messenger ribonucleic acid levels and androstenedione production in hen granulosa cells. *Biol Reprod* 49(6):1293-302

Lin L, Achermann JC (2008) Steroidogenic Factor-1 (*SF-1*, *Ad4BP*, *NR5A1*) and disorders of testis development. *Sex Dev.* 2(4-5): 200-209

Liu J, Rone MB, Papadopoulos V (2006) Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis. *J Biol Chem.* 281(50):38879-93

Liu HY, Zeng WD, Cao AL, Zhang CQ. 2010 Follicle-stimulating hormone promotes proliferation of cultured chicken ovarian germ cells through protein kinases A and C activation. *J Zhejiang Univ Sci B.* 11(12):952-7

Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 139: 265-275

Martel C, Labrie C, Dupont E, Couet J, Trudel C, Rheaume E, Simard J, Luu-The V, Pelletier G, Labrie F (1990a) Regulation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase expression and activity in the hypophysectomized rat ovary: interactions between the stimulatory effect of human chorionic gonadotropin and the luteolytic effect of prolactin. *Endocrinology* 127(6):2726-37

Martel C, Labrie C, Couet J, Dupont E, Trudel C, Luu-The V, Takabashi M, Pelletier G, Labrie F (1990b) Effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and prolactin (PRL) on 3 beta-hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 beta-HSD) expression and activity in the rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 20;72(2):R7-13



- Marrone LB, Wiebe P, Buckingham K, Hertelendy F (1985) Analysis of steroid metabolites produced by theca cells from the adult domestic hen. *J Steroid Biochem* 23: 375-378
- McElroy AP, Caldwell DJ, Proudman JA, Hargis BM (2004) Modulation of In Vitro DNA synthesis in the chicken ovarian granulosa cell follicular hierarchy by Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone. *Poult Sci.* 83(3):500-506
- Merchant-Larios H (1978) Ovarian differentiation. In; *The vertebrate ovary* (E.R. Jolnns, Ed) Plenum Press, New York pp 47-77
- Miller WL. (2005) Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology* 146(6):2544-50.
- Miller WL. (2008) Steroidogenic enzymes. *Endocr Dev.* 13:1-18
- Morrish B, Sinclair A (2002) Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction* 124: 447-457
- Mlynarczyk J, Rekawiecki R. (2010) The role of the orphan receptor SF-1 in the development and function of the ovary. *Reproductive Biology* 10(3): 177-193
- Molyneaux KA, Zinszner H, Kunwar PS, Schaible K, Stebler J, Sunshine MJ, O'Brien W, Raz E, Littman D, Lehmann R (2003) The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* 130(18): 4279-86
- Nakabayashi O, Kikuchi H, Kikuchi T, Mizuno S (1998) Differential expression of gene for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *J Mol Endocrinol* 20(2): 193-202
- Nakamura Y, Yamamoto Y, Usui F, Mushika T, Ono T, Setioko AR, Takeda k, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T (2007) Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo *Poult Sci.* 86(10):2182-93.
- Narbaitz R, Adler R (1966) Submicroscopical observations on the differentiation of chick gonads. *J Embryol Exp Morphol* 16: 41-47
- Narbaitz R, Kolodny L (1964) Delta-5-3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in differentiating chick gonads. 63: 612-617

Narbaitz R, De Robertis EM Jr (1968) Postnatal evolution of steroidogenic cells in the chick ovary. *Histochemie* 15(3): 187-93

Nishikimi H, Kanasaku N, Saito N, Usami M, Ohno Y, Shimada K (2000) Sex differentiation and mRNA expression of P450c17, P450arom and AMH in gonads of the chicken. *Mol Reprod Dev* 55: 20-30

Nitta H, Osawa Y, Bahr JM (1991) Immunolocalization of steroidogenic cells in small follicles of the chicken ovary: anatomical arrangement and location of steroidogenic cells change during follicular development. *Domest Anim Endocrinol* 8(4):587-94

Nomura O, Nakabayashi O, Nishimori K, Yasue H, Mizuno S (1999) Expression of five steroidogenic genes including aromatase gene at early developmental stages of chicken male and female embryos. *J Steroid Biochem Mol Biol* 71: 103-109

Oreal E, Mazaud S, Picard J, Magre S, Carre-Eusebe D (2002) Different patterns of Anti-Mullerian hormone expression, as related to DMRT1, SF-1, WT1, GATA-4, Wnt-4, and Lhx9 expression, in the chick differentiating gonads. *Developmental Dynamics* 225: 221-232

Parker KL, Schimmer BP (2002) Genes essential for early events in gonadal development. *Ann Med.* 34(3):171-8

Parker KL, Schimmer BP, Schedl A. (2001) Genes essential for early events in gonadal development. *EXS.*(91):11-24.

Payne HA, Hales BD (2004) Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews* 25: 947-970

Pedernera E, Gómez Y, Velázquez P, Juárez-Oropeza MA, González del Pliego M (1988) Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. *Gen Comp Endocrinol* 71: 153-162

Pelletier G, Li S, Luu-The V, Tremblay Y, Bélanger A, Labrie F (2001) Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450<sub>scc</sub>) 3 $\beta$ -hydroxysteroid

deshydrogenase and cytochrome P450c17 in rat adrenal cortex and gonads. J Endocrinol 171, 373-383

Richards, J.S. (1990). Maturation of ovarian follicles: Actions and interaction of pituitary and ovarian hormones and follicular cell differentiation. Physiol Rev 60: 51-89

Richards JS, Pangas SA (2010) The ovary: basic biology and clinical implications. J of Clin Invest 120 (4) 963-972

Robinson FE, Etches RJ, Anderson-Langmuir CE, Burke WH (1988) Steroidogenic relationships of gonadotrophin hormones in the ovary of the hen (*Gallus domesticus*). Gen Comp Endocrinol 69(3):455-66

Robyr D, Wolffe AP, Wahli W (2000) Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. Mol Endocrinol 14(3): 329-347

Rodgers RJ, Waterman MR, Simpson ER, Magness RR (1988) Immunoblot analysis of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 and adrenodoxin in corpora lutea of cyclic and late-pregnant sheep. J Reprod Fertil 83(2):843-50

Sasano H, Okamoto M, Mason JI, Simpson ER, Mendelson CR, Sasano N, Silverberg SG (1989) Immunohistochemical studies of steroidogenic enzymes (aromatase, 17 alpha-hydroxylase and cholesterol side-chain cleavage cytochromes P450) in sex cord-stromal tumors of the ovary. Hum Pathol 20(5):452-7

Sasano H, Mason JI, Sasano N (1989) Immunohistochemical analysis of cytochrome P-450 17 alpha-hydroxylase in pig adrenal cortex, testis and ovary. Mol Cell Endocrinol 62(2):197-202

Sasano H, Mori T, Sasano N, Nagura H, Mason JI (1990) Immunolocalization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human ovary. J Reprod Fertil 89(2):743-51

Scheib D (1983) Effects and role of estrogens in ovarian gonadal differentiation. Differentiation 23: 887-892.

Scheib D, Haffen K (1967) Etude histochemique de la 3 $\beta$ -hydroxistéroïde déshydrogénase dans les jeunes gonades embryonnaires de Poulet. C R Acad Sci 264: 161-164

Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL, Capel B (2000) Sry induces cell proliferation in the mouse gonad Development 127: 65-73

Sekido R. (2010) SRY: A transcriptional activator of mammalian testis determination. Int J Biochem cell Biol 42(3): 417-420

Sekido R, Lovell-Badge R (2008) Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. Nature 453: 930-934

Shen WH, Moore CC, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA (1994) Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the Müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. Cell 77: 651-661

Shimada K (1998) Gene expression of steroidogenic enzymes in chicken embryonic gonads. J Exp Zool 281: 450-456

Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH (2005) Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. Endocr Rev 26(4):525-82

Sinclair, AH (1998) Human sex determination J Exp Zool 281: 501-505

Smith CA (2010) Sex determination in birds: a review. Emu 110: 364-377.

Smith CA, Sinclair AH (2001) Sex determination in the chicken embryo. J Exp Zool 290: 691-699

Smith CA, Sinclair AH (2004) Sex determination insights from the chicken. Bioessays 26: 120-132

Swain A, Lovell-Badge R (1999) Mammalian sex determination a molecular drama. Genes & Development 13: 755-767

Teng CT, Teng CS (1977) Studies on sex organ development: the hormonal regulation of steroidogenesis and adenosine 3'5' cyclic monophosphate in embryonic chick ovary. Biochem J 163: 123-134

Teng CT, Teng CS (1979) Studies on sex organ development; Separation and culture of steroid-producing cell from growing and regressing embryonic ovaries. *Endocrinology* 104: 1337-1343

Teng CT, Teng CS, Bousfield GR, Liu WK, Ward DN (1982) Differential response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. *Gen Comp Endocrinol* 48:325-332

Tennant JR (1964) Evaluation of the trypan blue technique for the determination of cell viability. *Transplantation* 2: 685-694

Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL (1991b) Cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc) in the hen ovary. II. P450scc messenger RNA, immunoreactive protein, and enzyme activity in developing granulosa cells. *Biol Reprod* 45(6):967-74

Tilmann C, Capel B (2002) Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *Recent Prog Horm Res* 57: 1-18

Toaff ME, Strauss JF, Hammond JM (1983) Regulation of cytochrome P450scc in immature porcine granulosa cells by FSH and estradiol. *Endocrinology* 112: 1156-1158

Trzeciak WH, Waterman MR, Simpson ER (1986) Synthesis of the cholesterol side-chain cleavage enzymes in cultured rat ovarian granulosa cells: induction by follicle-stimulating hormone and dibutyryl adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 119(1):323-30

Val P, Lefrancois AM, Veyssiere G, Martinez A (2003) SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nuclear Receptor* 1(8): 1-49

Velázquez PN, Peralta I, Pedernera E (1997) Proliferative effect in vitro of follicle-stimulating hormone on the left ovary of the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 105: 40-49

Veldhuis JD, Rodgers RJ (1987) Mechanisms subserving the steroidogenic synergism between follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I (somatomedin C). Alterations in cellular sterol metabolism in swine granulosa cells. *J Biol Chem* 5;262(16):7658-64

Veyrunes F, Waters PD, Miethke P, Rens W, McMillan D, Alsop AE, Grützner F, Deakin JE, Whittington CM, Schatzkamer K, Kremitzki CL, Graves T, Ferguson-Smith MA, Warren W, Marshall Graves JA (2008) Bird-like sex chromosomes of platypus imply recent origin of mammal sex chromosomes. *Genome Res* 18(6):965-73

Vien H, Lee Y, Leo T, Lee O, Chow BK (2008) Gonadotropin-releasing hormone:regulation of the GnRH gene. *J Febs* 275: 5458-5478

Villalpando I, Sánchez-Bringas G, Sánchez-Vargas I, Pedernera E, Villafán-Monroy H (2000) The P450 aromatase (P450 arom) gene is asymmetrically expressed in a critical period for gonadal sexual differentiation in the chick. *Gen Comp Endocrinol* 117(3):325-34

Weniger JP, Zeiz A (1987) 17 $\beta$ -estradiol secretion by the ovary of the hypophysectmized chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 65: 9-11

Weniger JP, Chouraqui J (1988) Action of LH on the secretion of estradiol by the chick embryonic ovary in in vitro culture. *Reprod Nutr Dev* 28:1473-7

Wiebe JP, Buckingham KD, Zobell RL, Hertelendy F (1990) Metabolism of progesterone by avian granulosa cells in culture *J Steroid Biochem Mol Biol* 37(1):113-20

Wilhelma D, Washburnb LL, Truonga V, Fellousc M, Eicherb EM, Koopmana (2009) Antagonism of the testis- and ovary-determining pathways during ovotestis development in mice. *Mechanisms of development* 126: 324-336

Woods JE, Brazzill DM (1981) Plasma 17 $\beta$ - estradiol levels in the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 44: 37-43

Woods JE, Erton LH (1978) The synthesis of estrogens in the gonads of chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 36: 360-370

Woods JE, Mennella JA, Thommes RC (1981) The hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axes in the developing chick embryo. I. LH sensitivity. *Gen Comp Endocrinol* 45: 66-73

Woods JE, Scanes CG, Seeley M, Cozzi P, Onyeise F, Thommes RC (1989) Plasma LH and gonadal LH-binding cells in normal and

surgically decapitated chick embryos. Gen Comp Endocrinol 74(1):1-13

Zeleznik AJ, Midgley AR Jr, Reichert LE Jr (1974) Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. Endocrinology 95(3):818-25

Zhou J, Cidlowski JA (2005) The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. Steroid 70: 407-417

Zubair M, Oka S, Parker K, Morohashi K. (2009) Transgenic Expression of Ad4BP/SF-1 in Fetal Adrenal Progenitor Cells Leads to Ectopic Adrenal Formation. Mol Endocrinol. 23(10): 1657-1667