

24/82



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**FUNCION ESTEROIDOGENICA DEL
OVARIO EN POLLO RECIENTE NACIDO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
YOLANDA DE LAS MERCEDES GOMEZ Y GOMEZ



México, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Resumen	3
Introducción.....	4
Desarrollo gonadal	4
Síntesis de esteroides durante en el desarrollo embrionario de las aves	9
Esteroidogenesis en el ovario de mamíferos, aves y su regulación por gonadotropinas hipofisarias	11
Principales vías de biosíntesis de esteroides	13
Biosíntesis de esteroides a nivel celular	16
Morfología del ovario de aves adultas en comparación con mamíferos	18
Células esteroidogénicas del ovario de mamíferos	19
Planteamiento del problema	22
Material y métodos	23
Disgregación celular	23
Control de viabilidad celular	24
Técnica histoquímica	25
Técnica del radioinmunoanálisis	26
Coefficientes de variación del radioinmunoanálisis	27
Especificidad del radioinmunoanálisis	30
Resultados	32
Secreción de 17 β -estradiol y testosterona en el ovario	32
Porcentaje de tipos celulares utilizando tripsina	34

Curvas de dosis respuesta a HCG	35
Distribución de células ováricas en el gradiente	36
Células ováricas de los 30 min obtenidas del gradiente	37
Porcentaje de células con reacción positiva a la 3β -HSD.	38
Secreción de las células ovaricas obtenidas del gradiente	39
Discusión	40
Conclusiones	44
Bibliografía	45

RESUMEN

En este estudio se utilizaron ovarios izquierdos de pollo recién nacidos que fueron disociados a diferentes tiempos utilizando una solución de tripsina al 0.25%.

Cuantificamos la secreción de 17β -estradiol y testosterona en condiciones basales y con estímulo de gonadotropina coriónica humana (hCG).

La máxima actividad esteroidogénica fue obtenida en la población aislada a los 30 min de incubación con tripsina. Estas células fueron purificadas en un gradiente de metrizamida (0-30%) y se separaron seis poblaciones celulares, las cuales fueron incubadas en Dulbecco-albúmina-xantina durante 2 hr. a 37° C en un baño con agitación.

A estas poblaciones celulares se les cuantificó la secreción de 17β -estradiol y testosterona en condiciones basales y con estímulo de hCG.

Concluimos que la actividad esteroidogénica del ovario de pollo esta en la médula del ovario, y que existen dos poblaciones celulares, que presentan diferente densidad y características morfológicas.

Las células que secretan testosterona se obtienen en la banda de baja densidad, contienen vacuolas lipídicas y características ultraestructurales de células esteroidogénicas, mientras que las células que producen 17β -estradiol son poco diferenciadas y no tienen características citológicas de células esteroidogénicas.

DESARROLLO GONADAL

En los vertebrados las gónadas se desarrollan a partir del borde superior de la capa visceral del mesodermo lateral en la mitad posterior del cuerpo. El primer esbozo de la gónada aparece formando una banda longitudinal de epitelio mesodérmico que va engrosándose para formar la cresta genital (Balinsky 1975).

Desde el punto de vista embriológico la gónada se forma por dos tipos de células; las células somáticas de origen mesodérmico y las células germinales primordiales (CGP), que por su temprana diferenciación pueden considerarse de origen autónomo.

Las CGP en la especie humana se reconocen tempranamente en la ontogénesis, son más grandes que las células somáticas, de citoplasma claro, núcleo grande vésiculoso y redondo con nucleolos 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, esterasas, abundante glucógeno y un acúmulo de proteínas denominadas "nuage" en su citoplasma (Byskov 1986, Austin y Short 1982).

Estas células muestran ciertas peculiaridades; su origen extragonadal, su capacidad de migración, su habilidad para establecer contacto con células somáticas y finalmente su capacidad de proliferación.

Las células germinales aparecen en etapas tempranas del desarrollo embrionario, en el ratón es en el sexto día de desarrollo, en el pollo se pueden distinguir antes de la

gastrulación y en el humano aparecen por el día 22 de vida embrionaria, en el endodermo de la alantoides; en todos los casos estas células migran posteriormente hacia el primordio gonadal. 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 mesenterio dorsal para arribar en la quinta semana al primordio gonadal. El proceso migratorio se realiza por dos tipos de movimiento: translocación pasiva y desplazamiento amebode activo. El primero ocurre cuando las células germinales primordiales 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 ahora se encuentran localizadas en el epitelio del intestino posterior. Mediante su capacidad de movimientos ameboides las células germinales primitivas abandonan este sitio, migrando lateralmente hacia las regiones urogenitales.

Existen diferentes teorías sobre la migración de las CGP, se piensa que las crestas genitales producen una sustancia quimiotáctica que atrae a las células sexuales primitivas. La única prueba de la existencia de dicha sustancia proviene de estudios de células en medio de cultivo. Se cree que las dos crestas genitales producen diferentes cantidades de sustancias quimiotácticas, ya que en las aves llegan más células germinales a la gónada izquierda que a la derecha. Las discrepancias en el

número de células de la gónada izquierda y derecha de los mamíferos también están bien documentados aunque la variación es menos evidente que en pollos (Austin y Short 1982).

Otros investigadores opinan que la migración de las células primordiales hacia la gónada es posible porque existe un camino trazado de proteínas que facilitan su llegada (Biskov, 1986). Por otra parte estudios recientes nos indican que por lo menos algunas de las células pueden viajar ocasionalmente de manera pasiva por el torrente sanguíneo, este tipo de migración es muy común en aves y en los reptiles primitivos como *Sphenodon punctatus* y puede presentarse en algunos mamíferos como vaca, cerdo y oveja (Merchant-Larios 1978; Austin 1982).

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 del testículo; tejido cortical formado a partir del epitelio celómico, que puede formar los cordones corticales o sea el sustrato del ovario; mesénquima que formara el resto de las gónadas de ambos sexos incluyendo la teca y el

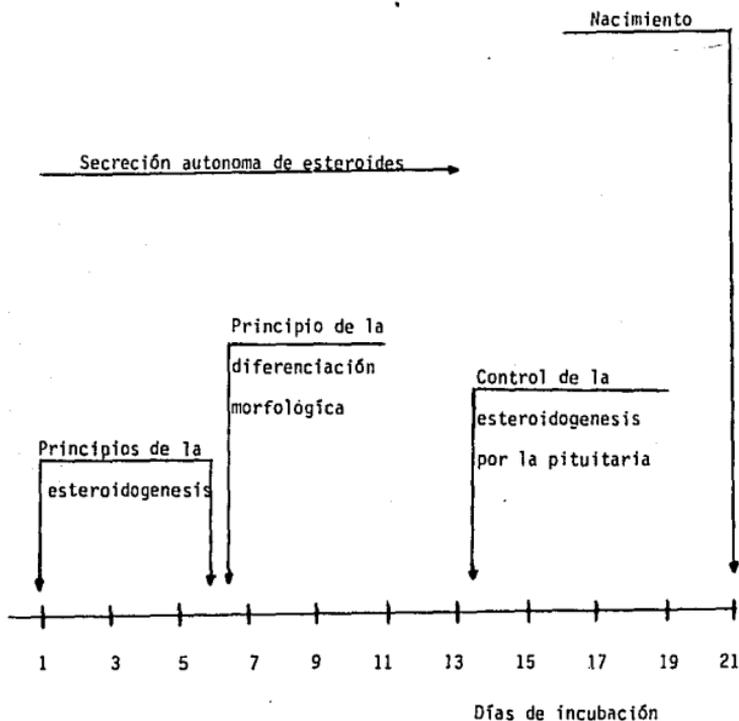
tejido intersticial, contiene también las células germinales primordiales, que tienen su origen fuera de la gónada que formaran las ovogonias o las espermatogonias, de acuerdo con su constitución genética.

Como lo mencionamos, el ovario se va a caracterizar por una diferenciación de la corteza la cual formará el tejido propio del órgano 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.

En la mayoría de las aves el sistema reproductor femenino, se desarrolla unilateralmente solamente el ovario izquierdo y el oviducto izquierdo son funcionales. El crecimiento del ovario derecho es normal hasta el octavo o décimo día, empezando una regresión en el día doce de vida embrionaria, tendiendo a convertirse en un ovario diminuto y rudimentario. Esencialmente el ovario izquierdo empieza a desarrollarse a partir del tercer día de incubación, cuando las células germinales y las mesenquimatosas son incorporadas en el epitelio germinal. Durante el sexto y séptimo día los cordones sexuales se forman, del octavo al décimo día el epitelio germinal prolifera formando la corteza y los cordones sexuales secundarios. Después aparecen los ovocitos y rápidamente se multiplican hasta el día 17 de incubación (Hughes 1976).

En estadios tempranos el desarrollo de la gónada en las aves es independiente de la hipófisis. Esto sugiere que durante ese tiempo las hormonas esteroides son producidas en forma autónoma por la gónada.

La etapa en que la adenohipófisis empieza a sintetizar gonadotropinas en las aves es a los 13.5 días de incubación, por lo que la gónada se hace dependiente de la hipofisis a partir de este período (Gilbert 1971).



RELACION DE LOS EVENTOS MAS IMPORTANTES DE LA ETAPA EMBRIONARIA DE UN POLLO.

SINTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE LAS AVES

En la gállina se producen tres tipos de hormonas; estrógenos, andrógenos y progestágenos, en el desarrollo embrionario de las aves, se ha descrito que en el ovario la biosíntesis de hormonas esteroides es a partir de los siete días de incubación, habiéndose identificado la producción de 17β -estradiol, estrona, progesterona y testosterona. (Weniger y Zeiz 1971; Galli y Wasserman 1973; Guichard et al. 1973; Teng y Teng 1977; González et al. 1983).

Actualmente 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 total de esteroides aumenta durante el desarrollo de las gónadas de ambos sexos, en las gónadas femeninas hay mayor producción de estrogénos (E_1+E_2) que las gónadas de los machos, esto podría ser obvio por el sexo, pero la producción de testosterona también es más alta en las hembras que en machos hasta el día 15, después es lo contrario (Guichard et al. 1977).

Estudios morfológicos e histológicos han mostrado que las células responsables de la producción de esteroides son las células intersticiales situadas en la médula del ovario de embriones de pollo (Narbartz 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, reticulo endoplasmico liso, poliribosomas, abundantes gotas de lípidos (Jordanov et al. 1978; Erickson et al. 1985; González del Pliego et al. 1988), colesterol y más específicamente una reacción positiva a 5- β -HSDH (Narbaitz y Robertis 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 ovarios de pollo con 24 horas de vida (González-Moran et al. 1985).

La secreción de hormonas esteroideas, como ya comentamos está regulada por las gonadotropinas hipofisiarias a partir de los 13.5 días del desarrollo embrionario del pollo, anterior a los 13.5 días es autónoma, mientras que después de este período embrionario, la síntesis de estrógenos está bajo control de gonadotropinas producidas por la adenohipofisis (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 estradiol (E_2), testosterona (T) y progesterona (P_4) (Teng y Teng 1977., Guichard et al. 1979, Woods et al. 1981).

Medidas morfométricas demostraron que el tamaño de las células esteroideogénicas de la médula del ovario aumentan cuando son estimuladas con hCG, sus organelos citoplasmáticos también sufren modificaciones la más revelantes el incremento de las vesículas del reticulo endoplasmico liso, el número de mitocondrias con crestas tubulares también aumentadas, las gotas de lípidos del citoplasma son abundantes y el complejo de Golgi

está bien desarrollado. No hay cambios evidentes en el retículo endoplásmico rugoso y polirribosomas (González del Pliego et al. 1988).

En condiciones de cultivo, los ovarios de pollo producen estradiol y testosterona, cuando son incubadas en ausencia de un precursor esteroide y acumulan las hormonas esteroides en el medio de cultivo las primeras 24 horas. Durante el crecimiento y la regresión del ovario de pollo, cuando son estimulados con gonadotropina responden con un aumento en el AMP'c y en la producción de estradiol y testosterona (Cedard et al. 1968; Teng y Teng 1979, Woods et al. 1981).

ESTEROIDOGENESIS EN EL OVARIO DE MAMIFEROS, AVES Y SU REGULACION POR GONADOTROPINAS HIPOFISARIAS

Los ovarios, los testículos y las suprarrenales secretan hormonas esteroides, el núcleo de estos esteroides se compone de un anillo ciclopentanofenántrico como el colesterol, las diferentes hormonas difieren en su composición de sus cadenas laterales. Entre las hormonas esteroides se encuentran los estrógenos u hormonas femeninas, las más importantes son 17β -estradiol y la estrona; los andrógenos u hormonas masculinas como la testosterona y la 5α -dihidrotestosterona.

El ovario tiene la capacidad de sintetizar tres tipos de hormonas esteroides, estrógenos, progesterona y andrógenos. Las dos primeras son las más importantes porque presentan la función específica del ovario, sin embargo los andrógenos son metabolitos indispensables para la formación de estrógenos.

De los estrógenos formados, los más importantes son 17β -

estradiol, estrona y estriol de ellos el primero es el que tiene mayor actividad biológica (Malacara et al. 1981).

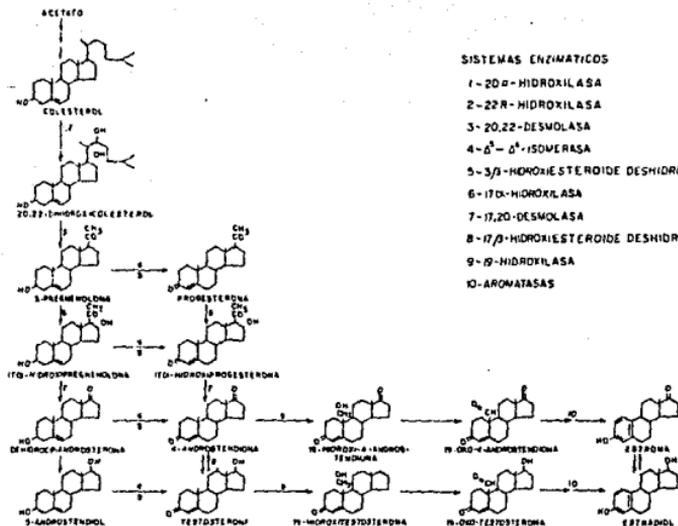
El acetato es el precursor primario para la síntesis de todos los esteroides. La vía implica la síntesis inicial del colesterol, el cual después de desdoblamientos de la cadena lateral y oxidaciones, es convertido en pregnenolona. La pregnenolona es el esteroide pivote del cual derivan las demás hormonas esteroides.

La síntesis de esteroides en el ovario puede ocurrir por la vía $\Delta 5$, directamente de pregnenolona, o por la vía $\Delta 4$ de progesterona. La pregnenolona es convertida a progesterona por una deshidrogenasa, la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa $\Delta 5$ -isomerasa (3β HSDH, $\Delta 5$ -isomerasa).

La pregnenolona y la progesterona se convierten en andrógenos como la dehidroepiandrosterona y la androstenediona, por medio de una hidroxilación en la posición 17, seguida de la eliminación de la cadena lateral del carbono 21 por el complejo hidroxilasa/liasa.

Los andrógenos se transforman en estrógenos, la androstenediona puede ser directamente aromatizada a estrona o primero convertirse a testosterona por la acción de la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y aromatizarse luego a estradiol.

La 17β -hidroxilación de androstenediona a testosterona o de estrona a estradiol, son reacciones reversibles y juegan un papel regulatorio en la cantidad de estrógenos producidos por el ovario. (Harper et al. 1980; Malacara et al. 1981).



SISTEMAS ENZIMATICOS

- 1-20 α -HIDROXILASA
- 2-22R-HIDROXILASA
- 3-20,22-DESMOLASA
- 4- Δ^4 - Δ^5 -ISOMERASA
- 5-3 β -HIDROXISTEROIDE DESHIDROGENASA
- 6-17 α -HIDROXILASA
- 7-17,20-DESMOLASA
- 8-17 β -HIDROXISTEROIDE DESHIDROGENASA
- 9-19-HIDROXILASA
- 10-AROMATASAS

BIOSINTESIS DE ESTEROIDES EN EL OVARIO

La hipófisis anterior secreta 3 hormonas proteicas que tienen una influencia critica en el sistema reproductor. Estas hormonas gonadotróficas son; la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la prolactina.

En la hembra, la FSH promueve el crecimiento y el desarrollo de los folículos ováricos; se piensa que estimula el desarrollo de los folículos desde la fase antral hasta la preovulatoria. En el macho la FSH estimula el crecimiento de los túbulos seminíferos, e interviene en las primeras fases de la espermatogénesis.

La LH tiene varias acciones en la hembra. Primero estimula la síntesis de esteroides en todos los tipos celulares del ovario (el cuerpo lúteo, la teca, la granulosa y las células intersticiales). Su acción principal es estimular la conversión del colesterol en progesterona. Además la LH inducirá la ovulación de los folículos previamente preparados por la FSH. El aumento de la liberación de la LH de la hipófisis, responsable de la ovulación, es producida por una retroalimentación positiva del estradiol sobre el hipotálamo que causa una descarga del factor de liberación de la LH.

En el macho la LH estimula un aumento en la síntesis y la secreción de testosterona en las células de Leydig del testículo (Austin y Short 1982).

En las aves la esteroidogénesis es poco clara, sin embargo se ha tratado de aclarar con diversos experimentos. Por ejemplo Johnson y van Tienhoven (1980) midieron las hormonas sexuales , así como la LH, cada dos horas en el plasma de aves por periodos de 34 a 72 hrs, durante el ciclo ovulatorio.

Como resultado de numerosos estudios, los principales patrones hormonales en la sangre, durante el ciclo ovulatorio de la gallina han sido descritos. Durante el día, la concentración de LH y las hormonas esteroides son bajas, pero medibles. En la noche hay un pequeño aumento en la concentración de LH, progesterona y 17β -estradiol. Alrededor de 4 a 11 hrs. antes de la ovulación, la concentración de LH aumenta, 2 ó 3 veces de la concentración basal. Este incremento de LH fue acompañado con el incremento de la concentración de progesterona, testosterona, 17β -estradiol y estrona.

Otros investigadores observaron que la testosterona, 17β -estradiol y la LH aumentan antes de la ovulación. Shahahi et al (1975) y Hammond et al. (1980) dicen que la concentración de testosterona y 17β -estradiol sufren fluctuaciones durante el día cuando la concentración de LH fue baja pero estable (Gilbert 1984).

La producción de las hormonas esteroides durante la maduración de los folículos está regulada principalmente por la hormona luteinizante. Cuando las células de la granulosa de los folículos preovulatorios F1, F2 y F3 son estimulados con LH hay un incremento en la producción de progesterona (Marrone y Hertelendy 1985). Estudios "in vitro" e "in vivo" han demostrado que las células de la granulosa de los folículos pequeños F4 y F5 incrementan su producción de progesterona de 2 a 9 veces con LH bovina. En contraste con la respuesta a FSH que es menos marcada (Wells et al. 1985).

Las células de la teca particularmente de los folículos preovulatorios F3 y F4 convierten la progesterona y la

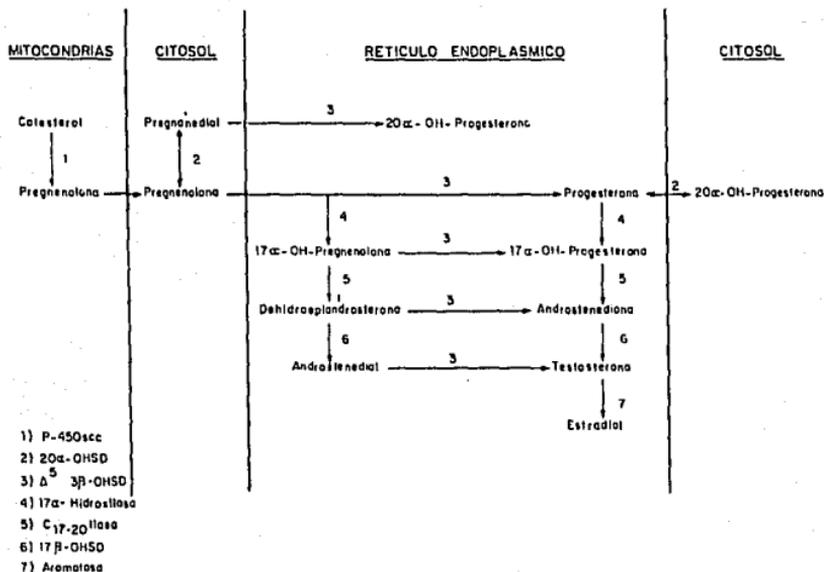
pregnenolona en 17 α -hidroxiprogesterona, androstenediona, testosterona y estradiol (Marrone et al. 1985). El folículo F3 es el que mejor responde a la estimulación de LH produciendo estradiol (Marrone y Hertelendy 1985).

BIOSINTESIS DE ESTEROIDES DEL OVARIO A NIVEL CELULAR

La síntesis de esteroides tiene lugar en dos membranas; en la membrana 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- β 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 fué sintetizada por la mitocondria, es aquí en el microsoma donde se lleva acabo la aromatización de los esteroides (Brodie, 1983).



SINTESIS DE ESTEROIDES A NIVEL CELULAR

MORFOLOGIA DEL OVARIO DE AVES ADULTAS EN COMPARACION CON LOS MAMIFEROS

La función morfológica del ovario de las aves ha sido revisada por Gilbert (1979) y es básicamente similar a los mamíferos. Sin embargo, el modo de reproducción de estas dos especies es diferente y por la cual hay diferencias en algunas estructuras y funciones.

En los mamíferos durante el ciclo estral se produce el desarrollo foliular. La LH es la responsable de la maduración de los folículos ovulatorios. Si no hay fertilización el ciclo se colapsa, pero si ocurre la fertilización los ciclos son impedidos durante todo el embarazo. En contraste, en las aves no hay ciclo estral bien definido, la actividad reproductora del ovario es continua aun durante parte de la crianza. La maduración foliular es secuencial y cada día con pocas excepciones, un nuevo folículo esta capacitado para madurar.

Una considerable diferencia entre la estructura del folículo de mamíferos y aves es el tamaño, el ovocito de mamíferos es pequeño y esta cubierto por una teca bien definida. Cuando se forma el antrum la teca interna se diferencia de la teca externa. La capa granulosa es multicelular y durante el crecimiento del antrum, una capa de células granulosas queda adyacente con el ovocito, no hay células intersticiales en el folículo.

En las aves el folículo es grande y tiene una gruesa capa de tejido conectivo que formará la teca. Las células intersticiales

están presentes y tienen la característica de ser células productoras de esteroides. El ovocito de aves crece en proporciones masivas, llena la cavidad del folículo a diferencia de los mamíferos, las células de la capa de la granulosa forman una capa simple de células, la cual persiste toda la vida de el folículo y no hay antrum. (Gilbert 1984).

En el ovario de las aves las células intersticiales, las células de la granulosa y las células de la teca están involucradas en la esteroidogénesis (Gilbert 1984). Las células de los folículos maduros producen la progesterona y no tienen actividad aromataza, mientras que las células de la teca producen 17β -estradiol, testosterona y androstenediona (Marrone y Hertelendy 1985).

CELULAS ESTEROIDOGENICAS DEL OVARIO DE MAMIFEROS

El ovario adulto de mamíferos contiene varios tipos de células secretoras de esteroides, las células de la granulosa, las células luteínicas, las células de las tecas y las intersticiales.

Las células intersticiales son clasificadas de acuerdo con su posición histológica dentro del ovario; células intersticiales primarias PI, células intersticiales de la teca interna TI, células intersticiales secundarias SI y células intersticiales del hilio HI. Estas células están localizadas en el tejido conectivo de la corteza y la médula.

La función principal de las células intersticiales es la síntesis y secreción de esteroides, andróstenediona y

testosterona, las características ultraestructurales de estas células son; retículo endoplásmico liso, mitocondrias con crestas tubulares y abundantes gotas de lípidos con colesterol (Erickson et al. 1985).

Las células intersticiales primarias aparecen a las doce semanas de gestación (en fetos humanos) en la médula del ovario y desaparecen por la 20va semana. Estas células están poco dispersas y están junto a los cordones corticales los cuales contienen ovogonias y ovocitos, durante su existencia estas células tienen una similitud con las células de Leydig del testículo fetal. Resultados "in vitro" nos indican que estas células tienen poca o ninguna capacidad para síntesis de esteroides de novo por la falta de colesterol, sin embargo no se puede descartar su actividad esteroidogénica a partir de precursores aportados por otra población celular.

Las células intersticiales de la teca son las células esteroidogénicas que se localizan en la teca interna del folículo en desarrollo, son las responsables de la producción de andrógenos los cuales mantienen o destruyen el folículo.

Durante la atresia, la granulosa y los ovocitos mueren, pero las células de la teca interna pasan por una marcada hipertrofia. Estas células hipertrofiadas son las llamadas células intersticiales secundarias. Estudios bioquímicos y citológicos indican que estas células tienen una ultraestructura característica de células secretoras de esteroides, responden a LH con un incremento en la producción de androstenediona. El ovario de mamíferos contiene células esteroidogénicas a lo largo del hilus del ovario, estas son raras por su aspecto y su

estructura, son idénticas a las células de Leydig del testículo indiferenciado. Estas células muestran abundante retículo endoplásmico liso y largos cristales de Reinke. Los cristales pueden ser albuminoides ligados intracelularmente con moléculas de testosterona. (Erickson et al. 1985).

Cuando las células de la teca interna y las células de la granulosa de los folículos preovulatorios son incubadas por separado, producen pocos andrógenos aun con la presencia de gonadotropinas (FSH y LH). Sin embargo cuando son cultivadas juntas aumenta la biosíntesis de estrógenos con o sin gonadotropinas. Las células de la granulosa producen principalmente progesterona bajo la influencia de FSH Y LH, mientras que las células de la teca sintetizan andrógenos bajo la influencia de LH. La producción de progesterona liberada por las células de la granulosa es utilizada por las células de la teca interna para sintetizar andrógenos, los cuales son además convertidos en estrógenos por las células de la granulosa que tienen una alta actividad aromotasa (Yi and Hsueh 1986). La cooperación entre estos dos tipos celulares es un requisito para la producción de estrógenos por las células de la granulosa. Esta es una de las contribuciones más recientes a la hipótesis bicelular en la síntesis de hormonas esteroides que fué inicialmente planteada por Falk (1959) y confirmada posteriormente por, Bjersin (1967); Forture y Armstrong (1977).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ovario de la gallina secreta estrógenos, andrógenos y progesterona. Dentro del ovario las células de la granulosa y de la teca participan en la esteroidogénesis (Gilber, 1984). Las células granulosas de los folículos maduros producen progesterona y pequeñas cantidades de testosterona y no tienen actividad aromatasa, mientras las células de la teca producen andrógenos y 17β -estradiol. (Huang et al. 1979; Marrone y Hertelendy 1985).

En la etapa prenatal de los pollos se han identificado las hormonas producidas por el ovario, describiéndose la secreción de 17β -estradiol, progesterona y testosterona entre otras. (Galli y Wassermann 1973; Guichard et al. 1977; Teng y Teng 1977).

Durante el desarrollo embrionario de las aves se ha descrito la presencia de células esteroidogénicas en los cordones de la médula subcortical (González del Fliego et al. 1988).

El objetivo de este trabajo es separar células con función esteroidogénica en el ovario de pollos recién nacidos y ver si son diferentes poblaciones de células las que secretan estos esteroides.

MATERIAL Y METODOS

Para éste estudio se utilizaron pollos recién nacidos de la raza Leghorn blanca, obtenidos de la granja Experimental Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., los cuales fueron sacrificados para diseccionar el ovario izquierdo.

DISGREGACION CELULAR

Se utilizaron dos métodos para la disgregación del ovario, una utilizando colagenasa y otra por medio de una solución de tripsina. Se comparan los resultados de ambas a fin de escoger el más útil para nuestro estudio. En el primer método el ovario izquierdo de los pollos recién nacidos es incubado en una solución de colagenasa (Sigma, tipo II) a una concentración de 1.4 mg/ml. La incubación se realizó a 37°C en un baño con agitación (90 ciclos/min), para lograr enzimáticamente la disgregación celular de los ovarios. Las células liberadas en el medio son recolectadas a los 30, 45, 60 y 75 min de incubación. Una vez obtenidas las células, se detiene la actividad enzimática mediante dos lavados con medio de incubación Dulbecco (MEM) que contiene 0.1% de albúmina bovina y centrifugado a 800 rpm durante 10 min para recoger el botón celular.

En otra serie de experimentos la disociación de los ovarios se realizó en tripsina al 0.25% diluida en una solución salina balanceada libre de Ca^{++} y Mg^{++} . Los tiempos de disociación con

esta enzima fueron a los 10, 20 y 30 min de incubación, la acción de esta enzima se detiene lavando dos veces las células con inhibidor de tripsina al 0.25% y centrifugando a 800 rpm por 10 min.

A continuación se incubaron alícuotas de las suspensiones de células ováricas obtenidas a los distintos tiempos en Dulbecco que contiene albúmina sérica bovina 0.1% (BSA) y 0.1 mM de metil-isobutil-xantina (MIX) con una atmósfera de CO₂ al 5% y 95% de aire, durante 2 hr. a 37°C, en un baño con agitación (90 ciclos/min.)

A los grupos experimentales estimulados con gonadotropina coriónica humana (hCG), se les adicionó 1U/ml de la hormona disuelta en el medio de incubación.

Al final de la incubación se colectó el medio y se cuantificó el contenido de la hormona esteroide liberada (17β-estradiol y testosterona) en el medio, por radioinmunoanálisis (RIA).

El control de la viabilidad de las células se realizó con la prueba de exclusión de colorante, azul tripano, las cuales mostraron un 90% de viabilidad después de la digestión celular.

En esta serie de experimentos las células ováricas obtenidas a los 30 minutos de incubación en tripsina, fueron sometidas a un gradiente continuo de Metrizamida de 0 a 30% de la siguiente manera. En la superficie del gradiente (que es de 4ml de metrizamida) se sembraron de 30 a 50 millones de células y se centrifugaron a 4000 x g durante 7 min., se separaron diferentes poblaciones celulares en bandas que se distinguen claramente.

Cada banda fué colectada por aspiración desde la parte superior del gradiente y colocada en un tubo de centrifuga para

ser lavadas dos veces con 10 ml de medio de incubación Dulbecco y centrifugando a 800 rpm. y finalmente resuspendidos en 2 ml de esté medio.

De las poblaciones celulares obtenidas del gradiente fueron tomadas alícuotas e incubadas en Dulbecco con 0.1% de BSA y 0.1 mM de MIX en una atmósfera de CO₂ al 5%, durante 2 hr. a 37°C en un baño con agitación 90 ciclos por min.

Transcurrido el tiempo de incubación se colecta el medio de incubación y cuantificamos la secreción de hormona esteroide de cada población celular por medio del radioinmunoanálisis (RIA).

El número de células fué contado con un hemocitómetro y la viabilidad estimada por la prueba de exclusión del azul tripano. Estas células fueron clasificadas de acuerdo con su morfología como: células con lípidos, células sin lípidos y ovocitos.

TECNICA HISTOQUIMICA

Las poblaciones celulares obtenidas del gradiente fueron sometidas a la prueba citoquímica Δ 5- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Δ 5- β -HSDH) adaptada para suspensión celular. (Payne, 1980).

TECNICA DEL RADIOINMUNOANALISIS

Curva estandar

1.-Pipetear por duplicado 0.2 ml de muestra titulada de testosterona o estradiol según sea el caso a cada tubo de ensayo. Preparar el tubo control de cuentas totales, el de unión no específica y la de unión en presencia de un estandar (UO).

- 2.-Pipetear por duplicado 0.2 ml de las muestras problema.
- 3.-Añadir 0.1 ml del esteroide tritado a todos los tubos (aproximadamente 4000 cuentas por minuto)
- 4.-Añadir 0.2 ml de antisuero antiesteroide (testosterona o estradiol) a todos los tubos excepto al tubo de cuentas totales y al de la unión no específica (UNE) a estos últimos añadir 0.2 ml de Buffer RIA.
- 5.-Agitar rápidamente y tapar.
- 6.-Llevarlos al baño maría a 37°C por un hora.
- 7.-Incubarlos otra hora en el cuarto frío a 4°C, y se les agrega a todos los tubos (menos a los de las cuentas totales) 500 ml de carbón activado que se prepara al momento de usarse y mantener en suspensión con agitación.
- 8.-Diez minutos después del último tubo que se le puso carbón centrifugar a 1500 x g por 15 min.
- 9.-Vertir el sobrenadante en viales y agregarles 6.4 ml de líquido de centelleo, tapar y agitar 30 segundos en vortex.
- 10.-Limpiar los viales con alcohol y colocarlos en el contador de centelleo (Packard 32-55) para ser leídos durante 4 minutos cada uno.

CURVAS DE COEFICIENTE DE VARIACION INTRAENSAYO E INTERENSAYO

Se utilizaron las curvas estandar de 4 radioinmunoanálisis para estimar los coeficientes de variación; la figura No. 1 representa la curva estandar de los radioinmunoanálisis donde se muestra el porcentaje de unión con respecto a la cantidad de testosterona, expresada en picogramos por tubo (pg/tubo), detectándose la sensibilidad del mismo.

El radioinmunoanálisis presenta un coeficiente de variación interensayo de 12.9% y un coeficiente de intraensayo de 4.6%

La figura, No.2 representa la curva estandar de estradiol y su coeficiente de variación es de 11.03%, y el coeficiente de variación intraensayoes de 4.9% por lo que se consideran modelos confiables y reproducibles.

El coeficiente de variación se obtiene de la desviación estandar dividida por la media y multiplicada por 100.

$$C.V. = SD/X \text{ por } 100$$

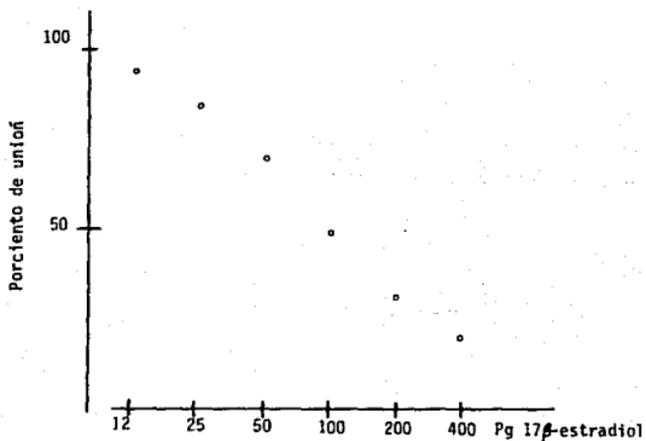
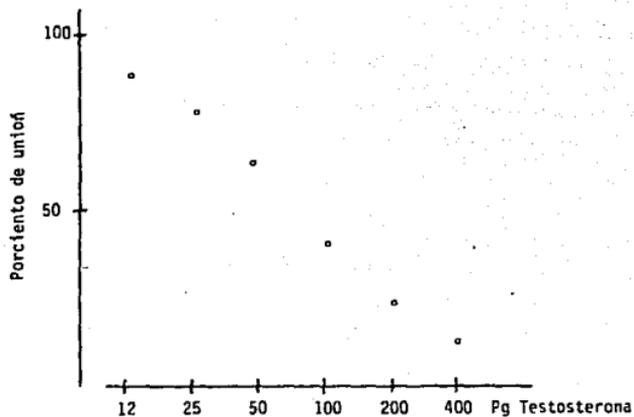


Fig. 1 y 2 Curva estandar de 17β -estradiol y testosterona de los radioinmunoanálisis donde se muestra el porcentaje de unión.

REACTIVOS

1.- Buffer RIA

Es una solución amortiguadora de fosfatos 0.15 M que contiene cloruro de sodio, azida de sodio, albúmina, fosfato monobásica y dibásico.

2.- Carbón activado dextran

0,5% peso/volumen Norit A, Carbón activado y 0.5% peso/volumen dextran T-70 en buffer RIA.

3.-Líquido de centelleo

Pesar 4 gr. de PPD (2,5 difenil oxazole), 200 mg. de dimetil-
POPO

(1,4,bis [4-metil-5-fenil-2-oxazolyl] benceno), 667 ml de tolueno y 333 ml de triton.

4.-Curva de titulación de estradiol

Preparar una solución estándar de estradiol de la siguiente manera, pesar 10 mg de 17 β -estradiol y disolverla en etanol absoluto (100 ml) quedándonos una concentración 0.1 mg/ml en alcohol. De aquí tomamos 0.1 ml y aforamos a 100 ml con buffer RIA dándonos una concentración 100 ng/ml en buffer RIA. Tomamos 100 microlitros y hacemos diluciones dobles con buffer RIA para obtener las siguientes concentraciones;

400 pg/ml

200 pg/ml

100 pg/ml

50 pg/ml

25 pg/ml

12.5 pg/ml

5.-Curva de titulación de testosterona

Se prepara de la misma forma que la de estradiol.

6.-Especificidad del radioinmunoanálisis

El anticuerpo antitestosterona utilizado posee una gran especificidad para la testosterona, como se observa en la tabla de reactividad cruzada.

Porcentajes de reacción cruzada:

ESTEROIDE	PORCENTAJE
Testosterona	100%
5 α -dehidrotestosterona	18.5%
5 α -androstenediona-3 α ,17 β -diol	3%
5-androstene-3 β ,17 β -diol	1%
Androstenediona	0.5%
5 α -androstane-3, 17-dione	0.18%
5 β -androstane-3, 17-dione	0.13%
Androsterona	0.09%
Progesterona	0.06%
Estrona	< 0.01%
Estriol	< 0.01%

El anticuerpo anti-estradiol tiene una alta especificidad como se observa en la siguiente tabla de reactividad cruzada.

Porcentajes de reacción cruzada:

ESTEROIDE	PORCENTAJES
17 β -estradiol	100%
Estriol	2.46%
17 α -estradiol	1.32%
Estrona	1.3%
Pregnenolona	0.01%
Progesterona	< 0.01%
Testosterona	< 0.01%

B.-Testosterona y estradiol radioactiva.

Se uso testosterona 1,2,6,7-³H (N) 98.8 Ci/mM (New England, Boston, Mass, U.S.A.).

El estradiol radioactivo es; estradiol 2,4,6,7-³H (Amersham, Londres), 92 Ci/mM.

RESULTADOS

En los ovarios de pollo que fueron disociados utilizando la solución de colagenasa (1.4 mg/ml) observamos que la máxima secreción de testosterona es a los 60 min con $0.2 \text{ ng}/10^6$ células en tanto que la de estradiol es de $0.5 \text{ ng}/10^6$ células y se obtuvo a los 75 min en condiciones basales.

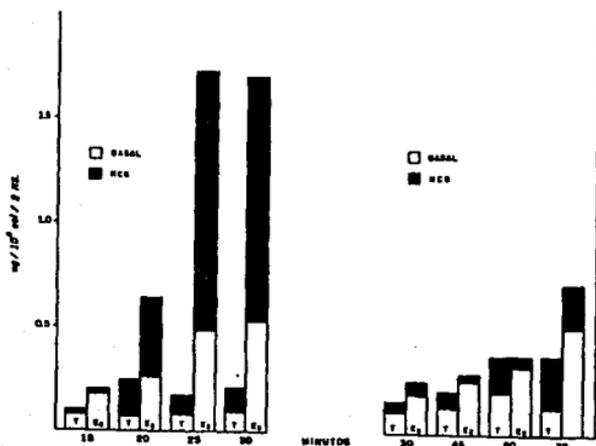


Fig. 3 Secreción de 17β -estradiol y testosterona en condiciones basales y de estímulo con hCG (1.0 UI/ml) de las poblaciones celulares obtenidas a diferentes tiempos de tratamientos con tripsina (izq) y con colagenasa (derecha)

Cuando estas poblaciones son estimuladas con hCG la mayor producción de testosterona ($0.39 \text{ ng}/10^6$ células) es a los 60 min, en tanto que la de estradiol a los 75 min. con $0.71 \text{ ng}/10^6$ células Fig No. 3

En esta misma gráfica se muestra la secreción de estradiol cuando se utiliza tripsina en la disociación de los ovarios. Observamos que la máxima producción de 17β -estradiol es a los 30 min. con $0.49 \text{ ng}/10^6$ células mientras que a los 20 min. se tiene la de testosterona ($0.095 \text{ ng}/10^6$ células). Cuando estas células son tratadas con hCG hay una respuesta máxima tanto de 17β -estradiol como de testosterona en estos mismos tiempos. En todos los resultados que se informan mas adelante se utilizó la disociación con tripsina debido a la mejor producción de las células esteroideogénicas.

En el estudio morfológico de las células del ovario obtenidas de la disociación enzimática con tripsina fueron clasificadas en tres tipos a) ovocitos, con un diámetro de 30 micras o más, b) células con gotas de lípidos en el citoplasma y con un diámetro próximo a 20 micras y c) células sin inclusiones de lípidos y con un diámetro similar a las de b). La proporción de los tres tipos celulares cambia en las fracciones obtenidas luego de las incubaciones con tripsina a los 10, 20 y 30 min. (tabla I).

Tabla I Porcentaje de tipos celulares en fracciones obtenidas a diferentes tiempos de incubación con tripsina.

	tiempo	células con lípidos	células sin lípidos	ovocitos
FI	10 min.	1.21	77.4	21.3
FII	20 min.	8.17	86.5	5.24
FIII	30 min.	14.2	83.0	2.68

El mayor porcentaje de ovocitos se obtiene en la fracción de 10 minutos, mientras que se reduce al 2.7% en la fracción de 30 minutos. Un fenómeno inverso ocurre con las células con inclusiones lipídicas que presentan un mayor porcentaje a los 30 minutos. Observaciones histológicas confirman que durante la incubación con tripsina, la corteza del ovario se disgrega en los primeros minutos, estando prácticamente disociada en su totalidad luego de los 20 minutos de incubación. El estudio de la secreción de las células ováricas que fueron obtenidas durante la incubación con tripsina muestran que los niveles más altos de estradiol se obtienen en la fracción de 30 minutos (Fig No 3).

En la curva de dosis respuesta con hCG de las células ováricas disociadas con tripsina a los 30 min. graficamos los promedios de dos experimentos y sus respectivas desviaciones estándar obteniendo que la DE_{50} para 17β -estradiol es 0.3 UI/ml, mientras que para testosterona es de 0.60 UI/ml. (fig. 4 y 5)

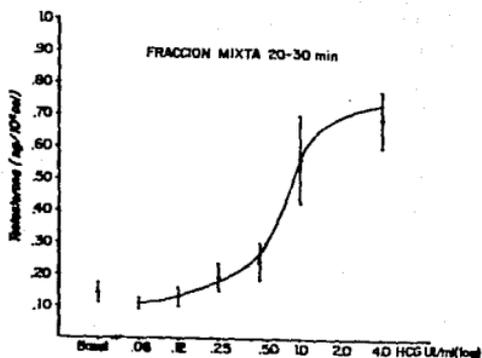
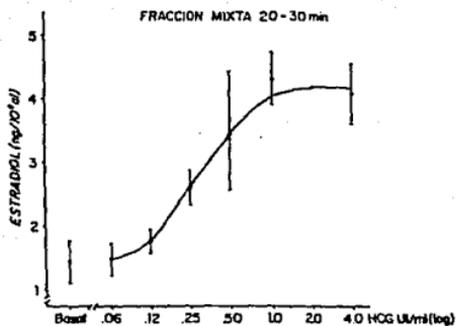


Fig. 4 y 5 Curva de dosis-respuesta a HCG cuantificando 17 β -estradiol (izquierda) y testosterona (derecha) en células ováricas disociadas con tripsina (30 min)

Las células obtenidas a los 30 min. de tripsina al ser separadas en función de su densidad en un gradiente continuo de metrizamina (0 a 30%) muestran una distribución de poblaciones celulares en banda como se representa en la figura No. 6



Fig.6 Distribución de las células ováricas obtenidas a los 30 min. con tripsina, separadas en función de su densidad. (Gradiente de Metrizamida)

La morfología de las células obtenidas del gradiente de densidad muestran que la segunda banda contiene sólo células con gotas de lípidos en su citoplasma, características que nos sugieren que son células esteroidogénicas. Esta segunda banda celular esta formada por el 100% de células con gotas lipídicas (Fig No 7).

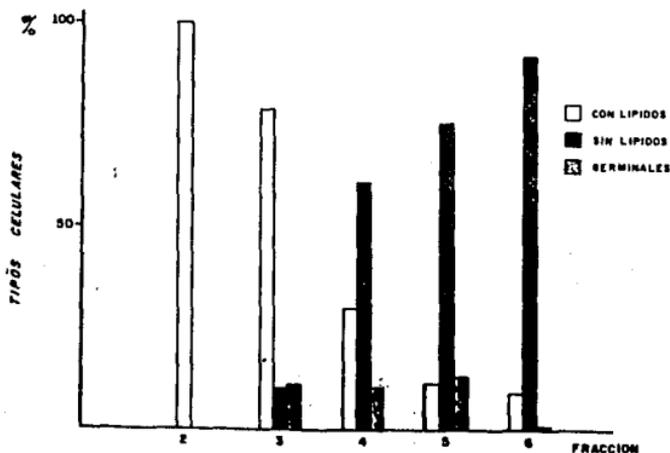


Fig. 7 Porcentajes de diferentes tipos celulares obtenidos de las diferentes fracciones de densidad de las células ováricas de los 30 min.

La sexta banda celular, presenta un 82% de células sin lípidos, un 4% de células con lípidos y 2% de ovocitos. Estos ovocitos se concentran en la banda IV. En las bandas restantes se obtienen valores intermedios en tipos celulares.

El porcentaje de células que son positivas para la 3β -HSD en cada una de las poblaciones celulares del gradiente muestran que las células positivas se ubican en la células de baja densidad, presentando la misma distribución que la observada con las células con gotas de lípidos en su citoplasma. fig. No. 8

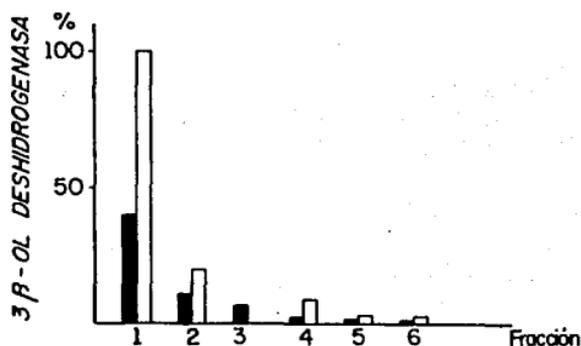


Fig.8 Porcentaje de células con reacción positiva a la 3β HSD en las fracciones de células ováricas obtenidas del gradiente de densidad. Se muestran los valores obtenidos con dos tiempos de incubación.  1 hr.  2 hr.

Cuando se analiza la secreción hormonal de las distintas bandas celulares se observa que la máxima producción de testosterona se localiza en la segunda banda celular con 3.8 ng/10⁶ células, mientras que la mayor producción de estradiol es de 2.84 ng/10⁶ células y se encuentra en la sexta banda celular que tiene una mayor densidad fig No. 9

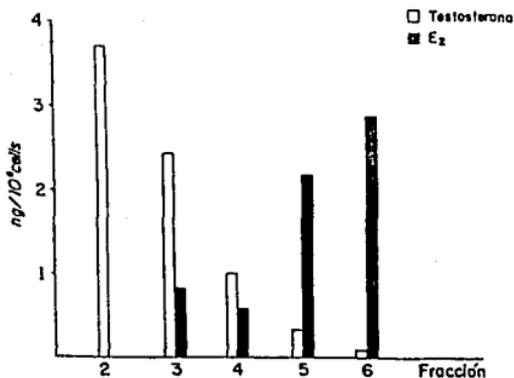


Fig. 9 Secreción de 17 β -estradiol y testosterona por las fracciones celulares ováricas obtenidas por el gradiente de densidad.

DISCUSION

Los ovarios de pollo recién nacidos fueron disociados utilizando dos tratamientos enzimáticos conocidos, el de la tripsina y el de la colagenasa.

La tripsina es una enzima proteolítica que rompe en grupo carboxilo de la arginina o de la lisina, mientras que la colagenasa es más específica rompe los enlaces peptídicos localizados en las regiones helicoidales características del colágeno (Boyer et al 1957; Strayer 1981).

Al hacer la prueba de exclusión de azul tripano de las células obtenidas con tripsina y colagenasa obtenemos una buena viabilidad (90% de células vivas) con ambas. En los dos casos cuando se le agrega al medio de cultivo hCG, se incrementa la secreción de 17β -estradiol y testosterona con lo que se comprueba la obtención de células funcionales.

Cuando se usa colagenasa en la disociación del ovario, tarda mayor tiempo el tejido en disgregarse y la secreción "in vitro" de 17β -estradiol y testosterona es menor en comparación con los resultados que se tienen con tripsina. Es difícil de explicar a que se debe la diferencia de secreción de las células tratadas con colagenasa y tripsina.

Al hacer el tratamiento con tripsina, recogiendo fracciones de células a diferentes tiempos, el mayor porcentaje de ovocitos lo tenemos a los 10 min. mientras que a los 30 min. obtenemos el menor porcentaje, ocurre lo inverso con las células con inclusiones lipídicas. De estos resultados y de las

observaciones histológicas podemos proponer que en los primeros min. de actividad enzimática, la corteza ovárica se disgrega casi por completo y a los 30 min. obtenemos una fracción enriquecida de células de la médula ovárica. Esto nos permite tener la información de la distribución regional de las células esteroidogénicas.

Al medir la secreción de 17β -estradiol y testosterona por radioinmunoanálisis observamos que las células de los 10 min. de incubación con tripsina no tienen una producción detectable, en tanto que las de 30 min. son las de mayor secreción. Estos resultados indican que la máxima actividad esteroidogénica estará en la médula y concuerda con estudios hechos por otros investigadores (Narbartz y Adler 1966; Jordanov et al. 1978; González del Pliego 1985), que describen las células esteroidogénicas típicas con mitocondrias de crestas tubulares, gotas lipídicas y retículo endoplásmico liso localizadas en la médula del ovario de embrión de pollo.

Es interesante señalar que durante la liberación de las células por el tratamiento enzimático la máxima secreción de testosterona se obtiene con las células aisladas después de 20 min de incubación con tripsina mientras que la máxima de 17β -estradiol se obtiene en las células obtenidas luego de los 30 min.

Este hecho sugiere que podrían ser diferentes poblaciones de células las que secretan testosterona y las que producen 17β -estradiol.

En la curva de dosis respuesta a hCG de las células ováricas disociadas con tripsina, tenemos que la DE_{50} de esta gonadotropina que estimula la secreción de estradiol es menor que la necesaria para testosterona. Esto puede interpretarse como que existen dos poblaciones celulares que tienen distinta sensibilidad a la gonadotropina coriónica, sin embargo no se puede descartar que debido a la biotransformación de testosterona en 17β -estradiol, la curva de respuesta de esta última se desplace a la izquierda, registrándose una DE_{50} menor.

Cuando las células ováricas de los 30 min. son separadas en función de su densidad en el gradiente de metrizamida, tenemos que la fracción de menor densidad (II) contiene sólo células con gotas de lípidos. Esto, sumado a que al cuantificar el porcentaje de las células con reacción positiva a la 3β -HSD en las fracciones obtenidas del gradiente tenemos que el mayor valor de células positivas se ubica en las bandas de baja densidad, puede tomarse como evidencia de que en la fracción II se esta recogiendo una población pura de células esteroidogénicas típicas. Al medir la secreción de estas fracciones por radioinmunoanálisis, tenemos que la fracción II es la que secreta mayor cantidad de testosterona sin que sea cuantificable la secreción de 17β -estradiol en la misma.

Por otra parte, la secreción de 17β -estradiol la obtenemos fundamentalmente en las fracciones de mayor densidad (V y VI), en esta fracciones la producción de testosterona esta disminuida comparada con la de la fracción II. Estos resultados sugieren fuertemente que son dos poblaciones celulares diferentes las que participan en la secreción de andrógenos y estrógenos y que las

mismas se ubican en la médula del ovario del pollo recién nacido.

CONCLUSIONES

En la disociación enzimática del ovario se observa una mejor disgregación en menor tiempo con tripsina que con colagenasa y una mejor actividad esteroidogénica tanto en la secreción de 17β -estradiol como de testosterona.

En las poblaciones de células que secretan las hormonas esteroideas tratados con hCG, se observa que hay una mayor producción de 17β -estradiol y de testosterona, lo que confirma que las células ováricas obtenidas por el método de disociación enzimática son funcionales.

La secreción de 17β -estradiol y testosterona del ovario de pollo recién nacido esta dada por poblaciones celulares que se encuentran en la región medular.

La secreción de testosterona se observa en células de baja densidad que contienen vacuolas lipídicas y características histoquímicas de células esteroidogénicas típicas.

Las células que producen 17β -estradiol tienen una mayor densidad y probablemente no tienen las características citológicas de células esteroidogénicas.

En la secreción de andrógenos y estrógenos en el ovario de pollo recién nacido participan dos poblaciones celulares distintas que pueden ser separadas en base a su densidad.

BIBLIOGRAFIA

Austin, R. C., y Short, V. R. (1982). Células germinales y fertilización. vol.1 Ed. La Prensa Médica Mexicana. pp 1-47.

Austin, R., y Short, V. (1982). Hormonas en la reproducción. vol.1. Ed. La Prensa Médica Mexicana. pp 1-27

Balinsky, B. I. (1975). Introducción a la embriología. Ed. Omega S. A. pp 375-381.

Bjersing, L., (1976). On the morphology and endocrine function of granulosa cells of follicles and corpora lutea. Acta Endocrinol (Suppl.) 125, 5-X

Brodie, A. M. H. (1983). Biosynthesis, metabolism, and secretion of ovarian steroid hormones. In Comprehensive endocrinology "The ovary" (G. B. Serra). Raven Press, New York, pp 1-16

Byskov, A., (1986). Differentiation of mammalian embryonic gonad. Physiol. Rev. 66, 74-117.

Erickson, G., Magoffin, D., Dyer, Ch., and Hofeditz, Ch. (1985). The ovarian androgen producing cell; A review of structure/function relationships. Endocr. Rev. 6, 371-392.

Falk, B., (1959). Site of production of oestrogen in rat ovary as studied by micro-transplant. Acta Physiol Scand (Suppl.) 47, 1-58

Galli, F. E., and Wasserman, G.F. (1973). Steroid biosynthesis by gonads of 7-and 10-day-old chick embryos. Gen. Comp. Endocrinol. 21, 77-83.

Gilbert, A. B. (1971). The endocrine ovary in reproduction. In Physiology and biochemistry of the domestic fowl. Bell and Freeman (eds) vol.3 Academic Press, New York. pp 1449-1464.

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

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

Guichard, A., Haffen., Cedard, L., Mignot, Th.-M., and Scheib, D. (1979). Effects of hCG and of season on "in vitro" steroidogenesis by 18-day chick embryo gonads. *Ann. Biol. Anim. biophys.* 19, 1317-1325.

Harper, H. A., Rodwell, W. V. y Mayes, A. P. (1980). Manual de química fisiológica. 7a edición Ed. Manual Moderno. pp 561-610.

Huang, E. S., and Nalbandov, A. V. (1979). Steroidogenesis of chicken granulosa and theca cells; "In vitro" incubation system. *Biol. Reprod.* 20, 442-253.

Hodges, (1974). The histology of the fowl. Ed. Academic Press Inc. London and New York. 326-347.

Hughes, G. C. (1963). The population of germ cells in the developing female chick. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 11 513-536.

Jordanov, J., Angelova, P., Boyadjieva-Michailova, A., and Bakalska, M. (1978). Ultrastructure of developing interstitial cells in chick embryonic gonad in relation to their genesis and steroidogenic function. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 92 449-464.

Malacara, M., Viveros, M., y Rodriguez-Valverde C. (1981). Fundamentos de endocrinología clínica. 3a edición Ed. La Prensa Médica Mexicana. pp 180-234.

Marrone, B. L., and Hertelendy, F. (1985). Decreased androstenedione production with increased follicular maturation in theca cells from the domestic hen (*Gallus domesticus*). *J. Reprod. Fert.* 74, 543-550.

Merchant-Larios, H. (1978). Ovarian differentiation. In; *The vertebrate ovary* (E. R. Jolnns, Ed.). Plenum Press, New York, pp 47-77

Narbaitz, R., and Adler, R. (1966). Submicroscopical observations on the differentiation of chick gonads. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 16, 41-47.

Narbaitz, R., and De Robertis, E. M. Jr., (1968). Postnatal evolution of steroidogenic cell in the chick ovary. *Histochemie* 15, 187-193.

Teng, C. T., and Teng, C. S. (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, C. T., and Teng, C. S. (1979). Studies on sex organ development; Separation and culture of steroid-producing cells from growing and regressing embryonic ovaries. *Endocrinology* 104, 1337-1343.

Teng, C. T., Teng, C. S., Bousfield, G. R., Lui, W. K., and Ward, D. N. (1982). Differential response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* 48, 325-332.

Wells, J.W., and Gilbert, A. B., (1984). Steroid hormone production by ovary, In *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. Bell and Freeman (eds) vol. 5 Academic Press, New York. pp 323-343.

Weniger, J.-P., and Zeis, A. (1971). Biosynthese d' oestrogenes par les ébauches gonadiques de poulet. *Gen. Comp. Endocrinol.* 16, 391-395.

Woods, J. E., and Ertton, L. H. (1978). The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 36, 360-370.

Woods, J. E., Mennella, J. A., and Thommes, R. C. (1981). The hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axes in the developing chick embryo. I. LH sensitivity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 45, 66-73.

Yi-Xun, L., and Hsueh W. A. (1986). Synergism between granulosa and theca-interstitial cell in estrogen biosynthesis by gonadotropic-treated rat ovaries: Studies on the two-cell, two-gonadotropin hypothesis using steroid antisera. *Biol. Reprod.* 35, 27-36.