

00381



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACION DE DOS SUBPOBLACIONES
CELULARES ESTEROIDOGENICAS EN EL
OVARIO DE POLLOS RECIENTE NACIDOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
P R E S E N T A:
M. en C. PEDRO NICOLAS VELAZQUEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1990



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 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.

CONTENIDO

	PASINA
INTRODUCCION.....	1-11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
OBJETIVOS.....	14
MATERIALES Y METODOS.....	15-21
RESULTADOS.....	22-40
DISCUSION.....	41-47
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFIA.....	49-56

INTRODUCCION

El ovario es capaz de sintetizar varios tipos de hormonas esteroides, a las que podemos agrupar en estrógenos, progestágenos y andrógenos. Estas hormonas tienen un profundo efecto sobre el desarrollo gonadal, la gestación y la conducta (Gilbert, 1971). Además, el ovario participa en otros tipos de secreciones tales como: a) inhibina, b) sustancias que intervienen en el control de la meiosis y c) otras sustancias intraováricas que localmente pueden controlar el crecimiento y la diferenciación folicular.

El ovario adulto presenta varios tipos de células secretoras de esteroides, células de la granulosa, tecales, luteínicas e intersticiales. Todas ellas poseen las enzimas necesarias para la síntesis de progesterona y andrógenos mientras que las células granulosas, tienen la capacidad de producir progesterona y aromatizar andrógenos (Richards, 1987).

Las características ultraestructurales comunes de las células esteroideogénicas son: mitocondrias con crestas tubulares, retículo endoplásmico liso (REL) bien desarrollado y cantidad variable de inclusiones lipídicas (Dahl, 1971 a,b,c), cabe mencionar que las células granulosas adquieren estas características cuando el folículo se luteiniza, después de la ovulación o en ocasiones durante la atresia folicular (Erickson y Hsueh, 1978).

PRODUCCION DE HORMONAS ESTEROIDES POR EL OVARIO DE LAS AVES

Las aves producen las tres principales clases de hormonas sexuales conocidas (estrógenos, andrógenos y progesterona), aunque

en estado embrionario las glándulas suprarrenales también son una fuente importante de esas hormonas esteroides (Tanabe et al, 1979). El ovario es el mayor productor de las mismas en estado adulto y aparentemente las células responsables de la esteroidogénesis son las células intersticiales, las tecales y las granulosa del folículo ovarico (Gilbert, 1979). El ovario de gallinas adultas, está compuesto por folículos de diferente tamaño, siendo los más pequeños de color blanco, con un diámetro entre 2 y 5 mm. A partir de los 6 mm el crecimiento es muy rápido, su color se torna amarillento y se clasifican como folículos preovulatorios F6 a F1 en orden creciente de tamaño. En las aves se presenta la liberación de un folículo cada 25 h y la denominación F1 a F6 está en relación con el tiempo que falta para la ovulación de dicho folículo, por ejemplo al F6 le faltan 6 días para la ovulación, mientras que el F1 es el folículo de mayor tamaño, que solamente permanecerá en el ovario 24 h antes de ser ovulado (Furr et al, 1973; Wilson y Sharp 1973; Senior y Cunningham 1974; Lanque et al, 1975; Johnson y Van Tienhoven 1980).

El folículo de las aves representa un sistema relativamente simple de esteroidogénesis en el cual las células granulosa parecen ser las productoras de progesterona y las tecales la fuente de andrógenos y estrógenos (Huang y Nalvandov, 1979).

La maduración de las células granulosa se caracteriza por un incremento en la respuesta a la estimulación por LH y el consiguiente aumento en la producción de progesterona, mientras que la maduración de las células tecales se caracteriza por un decremento en la sensibilidad a la estimulación por LH y una

reducción de la capacidad para convertir sustratos a 17 β -estradiol (Hammond et al, 1981). Este fenómeno mantiene una clara relación con el grado de maduración folicular, así pues se sabe que las células tecaes del folículo 3 (F3) son más sensibles a la estimulación por LH y muestran mayor capacidad para metabolizar testosterona a estrógenos, comparadas con las células tecaes de F1 (Marrone et al, 1983).

Las células granulosas pueden ser estimuladas por otras hormonas como la FSH. Existen evidencias de que este efecto estimulatorio tiene relación con los niveles de AMPc y que esto depende a su vez de una fosforilación catalizada por proteinquinásas dependientes de 3,5 AMPc (Wells et al, 1985). Sin embargo las cantidades necesarias para dicha estimulación son 30 a 40 veces mayores que la cantidad necesaria de LH, incluso se piensa que esta respuesta pudiera ser consecuencia de una contaminación de la FSH por LH (Wells et al, 1985).

Existe también relación entre el proceso de maduración folicular y el grado de estimulación por FSH en el tejido tecal, se ha comprobado un decremento considerable en el número de receptores a FSH en los folículos mayores F1 y F2 (Etches y Cheng, 1981).

Aunque no se forma un cuerpo lúteo en el ovario de las aves, es conocida la capacidad esteroidogénica del folículo postovulatorio, no se sabe la importancia funcional del mismo ya que esta estructura se mantiene por pocas horas (Shahabi et al, 1975; Armstrong et al, 1977; Dick et al, 1978; Huang y Nalvandov, 1979; Hammond et al, 1980; Tojo et al, 1982).

MORFOGENESIS DEL OVARIO EN LAS AVES

En las aves es característico el establecimiento de una asimetría gonadal en las hembras (Gilbert, 1979) con un desarrollo unilateral del ovario y del oviducto.

El ovario derecho crece lentamente desde el octavo día hasta el décimo día de desarrollo embrionario, posteriormente sufre una regresión hasta que presenta un aspecto rudimentario en el día 15 y deja de ser funcional en el nacimiento (Brode, 1928).

En cuanto al origen del ovario existen diferentes hipótesis, algunos autores han postulado que el blastema mesonefrico presente en el estado de 20 a 27 somitas, y que no participa en la formación de los túbulos y corpúsculos renales, proporciona células para la formación de la corteza suprarenal y la médula ovárica. Se ha propuesto que el establecimiento de una zona indiferenciada es el resultado de un proceso que involucra un doble desplazamiento de células en direcciones opuestas, las células medulares provienen del blastema mesonefrico y las células corticales se originan del epitelio celómico (Witschi, 1956). Otros autores interpretan la formación gonadal como resultado de dos proliferaciones consecutivas del epitelio celómico, la primera originaría la médula y la segunda la corteza ovárica (Willier, 1939; Benoit, 1950; Gallien, 1973).

A los 3.5 días de incubación, en embriones de pollo, algunas células germinales primordiales han alcanzado el epitelio genital, el cual es fácilmente distinguible del resto del epitelio celómico, debido a que está constituido por 2 o 3 capas celulares. Hacia la región dorsal un acúmulo de células se

distribuye irregularmente y se rodea por células mesenquimatosas bajas. Esta zona genital está claramente aislada por vasos sanguíneos y células mesenquimatosas bajas del área mesonefrica en la cual algunas nefronas (corpúsculos y túbulos renales) comienzan a organizarse. El epitelio genital está cubierto por una lámina basal bien desarrollada, la cual es frecuentemente interrumpida y desorganizada. Tanto las células somáticas como las células germinales preordiales se pueden observar pasando a través de su estructura, los acúmulos de células localizados en la superficie interna del epitelio genital no son rodeados por una lámina basal continua y frecuentemente las células se unen a través de la lámina, y se forman puentes entre el epitelio genital y los grupos de células internas.

Para el cuarto día de incubación, el anillo genital está haciendo una protrusión definida de la cavidad celómica, el epitelio superficial está constituido por 3 o 4 capas celulares y se continúa en algunos puntos con las células epiteliales internas. Ambos grupos celulares están ahora rodeados por una lámina basal continua, sin embargo ésta no se presenta hacia la parte más interna del tejido epitelial en crecimiento, lo que permite el contacto de estas células epiteliales con las mesenquimatosas, esto sugiere que el tejido epitelial está creciendo por proliferación de las células de origen epitelial y por incorporación de las células mesenquimatosas localizadas en la vecindad del epitelio genital.

Las células que se venían organizando como cordones epiteliales internos ahora constituyen los cordones medulares, no se pueden distinguir de las del epitelio superficial en etapas

en las etapas tempranas, las figuras mitóticas son comunes tanto en el epitelio en crecimiento como en las células mesenquimatosas. Este patrón inicial de desarrollo es dependiente de las características sexuales; en los machos el epitelio superficial cesa de proliferar y la mayoría de las células germinales migran hacia la parte interna de los cordones epiteliales, los cuales se liberaron del tejido en formación y continúan creciendo y diferenciándose (Stahl y Carlon 1973; Narbaitz 1971; Scheib 1970; Merchant-Larios 1978).

En las hembras el epitelio superficial de la gónada derecha, el cual parece ser similar al de la gónada izquierda durante estados tempranos, pierde su arreglo cúbico y forma una delgada capa de células aplanadas, separadas por los cordones epiteliales internos. La gónada izquierda sufre un crecimiento tanto en el epitelio interno como en el externo, así como un aumento en la vascularización e incremento en el tejido del estroma (Merchant-Larios 1978).

La participación de las hormonas sexuales en la morfogénesis temprana y la diferenciación gonadal, así como de los órganos accesorios del aparato reproductor, ha sido revisada por Wolff (1968) y Jost (1970) entre otros. La síntesis de hormonas sexuales está íntimamente relacionada a las células intersticiales (esteroidogénicas), integradas en el tejido intersticial gonadal (Hadjiloff, 1969).

La presencia y origen de estas células en estado embrionario ha sido estudiada desde principio de siglo (Nonidez 1922; Fell 1924). Benoit (1926) y Brode (1928), comparten la idea de que

estas células se derivan de cordones medulares o lacunares, que son resultado de una proliferación inicial del epitelio germinal y por lo tanto tienen origen epitelial. Stahl y Carlson (1973) las identifican como provenientes de cordones medulares ováricos de origen mesenquimatoso. Su aparición en el desarrollo se reporta desde el día 6 hasta el día 12. Narbaitz y Adler (1966) reportan su presencia en el sexto día de desarrollo, Budras y Preuss (1973) en el día 8, y algunos proponen su presencia entre el día 9 y 10, cuando se lleva a cabo una transformación lacunar en la médula ovárica encontrándose estas células entre las lagunas o integradas en las paredes de las mallas, Romanoff (1960) las reporta en etapas postembrionarias. Sin embargo actualmente aún no se puede afirmar en forma definitiva, cuando aparecen las células esteroideogénicas y se desarrollan en ambos sexos, si son elementos epiteliales o mesenquimatosos, qué estructuras participan en su desarrollo y tiempo cuál es la fisiología de su secreción.

ESTEROIDOGENESIS EN LA ETAPA EMBRIONARIA

El ovario derecho de las aves inicia un proceso de atrofia en el noveno día de incubación hasta que deja de ser funcional en el nacimiento, mientras que el ovario izquierdo continua su diferenciación hasta constituir un ovario funcional. Se supone que el ovario de las aves tiene una función esteroideogénica en etapas muy tempranas de desarrollo (Woods y Ertan 1978; Tanabe et al, 1983), y se tienen datos cuantificables desde el día 7 de incubación (Meniger 1971; Galli y Masserman 1973; Guichard et al, 1973 a,b). Se sabe además que los niveles plasmáticos de esteroides así como su secreción aumenta durante el desarrollo embrionario (Guichard et al, 1977; Woods y Brazzil, 1981) y que su

respuesta al ser estimulados por hormonas gonadotrópicas se aprecia claramente entre los 8 y 18 días de incubación (Woods y Ertou 1978; Guichard et al, 1979; Teng et al, 1982). Por medio de cultivo de órganos se conoce que a los 15 días de desarrollo, ambos ovarios son capaces de secretar hormonas esteroideas, en respuesta a un estímulo con HCG (Teng y Teng, 1977 a,b) aunque la capacidad de respuesta del ovario derecho es menor que la del izquierdo. Por los antecedentes antes mencionados es claro que el ovario de las aves proporciona un excelente modelo para estudiar la diferenciación de las células esteroideogénicas y la respuesta de las células a las hormonas como LH o FSH en diferentes etapas de desarrollo.

ESTEROIDOGENESIS EN EL OVARIO DE AVES ADULTAS Y SU CONTROL POR GONADOTROPINAS

El desarrollo de técnicas para la obtención de preparaciones puras de células granulosa de folículos pre-ovulatorios (Gilbert et al, 1977) y post-ovulatorios (Armstrong et al, 1977), ha facilitado el conocimiento de la función de estas células. Se ha demostrado que la producción de progesterona por las células granulosa de los folículos preovulatorios (F1), se incrementa notablemente al ser estimuladas por LH en cultivo de tejidos (Hammond et al, 1978; Huang y Nalvandov, 1979; Wells et al, 1980; Scanes y Fagioli, 1980). Los experimentos in vitro con las células granulosa separadas del tejido tecal, comprueban que existe una respuesta a las hormonas LH y FSH en todos los folículos preovulatorios aún en los más pequeños (F5 y F6), por lo

que se deduce que incluso las células granulosa de folículos menos maduros pueden segregar progesterona (Hammond et al, 1981). Existen diferencias en la capacidad de estímulo de la LH de aves con respecto a la LH de mamíferos (ovina) (Hammond et al, 1981; Robinson et al, 1988) sin embargo con ambos tipos se logra estimular la producción de progesterona en células granulosa de los folículos preovulatorios (F1 a F5) de aves.

Las células tecaales han sido aisladas por métodos enzimáticos y mecánicos y su capacidad, en cuanto a la producción de estrógenos se refiere, ha sido comprobada por numerosos autores (Huang y Naibandov, 1979; Marrone y Hertelendy, 1983 a,b). Cabe mencionar que existen diferencias en la secreción según el folículo preovulatorio de que se trate, pues las células de F2 y F3 producen cantidades considerables de estrógenos, mientras que las células de F1 y de folículos post-ovulatorios no segregan estrógenos (Huang y Naibandov, 1979). Al agregar progesterona a un medio de incubación con células tecaales de los folículos preovulatorios F2 y F3 se produce testosterona, y al incubar poblaciones mixtas de células tecaales y células granulosa, se observa un decremento en la producción de progesterona y un aumento en la producción de testosterona (Huang y Naibandov, 1979). En esta evidencia se apoyan los autores que postulan una teoría bi-celular, para tratar de explicar la síntesis de hormonas esteroideas en las aves, proponen que las células granulosa son las que se encargan de la producción de progesterona y las células tecaales las que producen estrógenos y andrógenos.

Los folículos pequeños (blancos), con un diámetro entre 2 y 3 mm parecen tener una alta concentración de 17- β estradiol (Senior

y Furr, 1975), aunque las células granulosas de estos folículos pequeños carecen de actividad de 3 β -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa 5-isomerasa (3 β -HSD) (Davison et al., 1979), por lo que es poco probable que las células granulosas produzcan en forma autónoma hormonas esteroideas y probablemente requieran de otro tipo celular como fuente de precursores. Evidentemente es necesario investigar el mecanismo que facilita la producción de andrógenos y estrógenos en este tipo de folículos. Es importante señalar que los folículos pequeños producen el 56% de los estrógenos del ovario (Armstrong, 1984).

La 3 β -HSD se localiza en las células granulosas y en las células tecales de los folículos preovulatorios de las aves, sin embargo la actividad de esta enzima en las células tecales se puede detectar entre las 8 y 30 semanas en folículos pequeños (Davison et al, 1979). Esta enzima se asocia generalmente con la fracción microsomal, por lo que se supone que en el tejido techal probablemente este relacionada a retículo endoplásmico rugoso (Wells y Gilbert, 1984).

La actividad de la 3 β -HSD en homogenados de granulosa y de tejido techal en folículos preovulatorios (F3 a F1), es completamente diferente. Mientras que en la granulosa aumenta a medida que el folículo crece, en el tejido techal se detecta la mayor actividad en los folículos de tamaño intermedio (F3 y F4) (Armstrong, 1982), esto coincide con una mayor producción de andrógenos en la teca de los folículos F3 (Bahr et al, 1983; Marrone et al, 1985 a,b).

Existen diferencias además, en la actividad de la 3 β -HSD en

todos los folículos, según el tiempo que falte para la ovulación, esto sugiere que puede haber un ritmo diurno de actividad enzimática en el folículo en desarrollo independientemente de los cambios cuantitativos y cualitativos asociados con el crecimiento folicular (Arastronq, 1982). Se ha sugerido que esos cambios pueden ser iniciados por el pico preovulatorio de LH, puesto que la actividad de la 3 β -HSD alcanza su nivel máximo entre 12 y 16 horas después de este pico. Por otro lado, este cambio parece coincidir con el tiempo en el que Etches y Cheng (1981) observan un incremento en el acoplamiento de FSH por el tejido techal. Posiblemente tanto la LH como la FSH, tengan un efecto sinérgico sobre la actividad de la 3 β -HSD en las células esteroideogénicas de los folículos preovulatorios, ya que existen diferencias en la actividad de esta enzima, en ovarios de pollos de 11 semanas de edad pretratados con LH (Arastronq y Wells, 1980).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque no se conoce el momento preciso en el que aparecen las poblaciones celulares que participan en la esteroidogénesis en el ovario de las aves, se tienen datos cuantitativos de la secreción de 17 β -estradiol y testosterona desde el día 7 de desarrollo embrionario (Meniger, 1971; Galli, 1973; Guichard, 1973 a,b) y se conoce que esta secreción aumenta a medida que se llega al nacimiento (Guichard et al, 1977). Los reportes histológicos nos indican la presencia de células con características esteroidogénicas en la médula ovarica (Narbaitz y Adler, 1966; Jordanov et al, 1978), así como de la enzima 3 β -HSD indispensable en la esteroidogénesis (Narbaitz y Kolodny, 1964; Scheib et al, 1967; Scheib y Haffen, 1969). En la médula del ovario de pollos recién nacidos se encuentra un 18% de células con características esteroidogénicas típicas (González Moran et al, 1985) y como se sabe que el ovario de pollo recién nacido secreta 17 β -estradiol, progesterona y testosterona. (Tanabe et al, 1979) surgen, de estas evidencias varios problemas que tentativamente se pueden analizar.

- Es importante identificar las células que son responsables de la esteroidogénesis en el ovario de pollo recién nacido y conocer cual es su localización en el ovario, ya que existe la posibilidad de que dos o más poblaciones celulares participen en la secreción de 17 β -estradiol, progesterona y testosterona.

También es necesario conocer el efecto que tienen las hormonas gonadotropicas LH y FSH sobre las células que participan

en la esteroidogénesis del ovario de pollo recién nacido.

En los folículos preovulatorios de gallinas adultas se ha comprobado que la síntesis de progesterona se lleva a cabo por la capa granulosa y que el tejido tecal segrega androstenediona, testosterona y 17 β -estradiol (Huang y Nalvandov, 1979), por lo tanto se puede pensar que en la teca exista más de una población celular encargada de la secreción de andrógenos y estrógenos. En ese caso sería interesante identificarlas y conocer la distribución de las mismas en el tejido tecal (teca interna o teca externa).

Se sabe que existen diferencias en cuanto a la secreción de progesterona, estrógenos y andrógenos en los distintos folículos preovulatorios F β a F α , es necesario tener en cuenta este fenómeno para la identificación de los tipos celulares y su posible variación en los diversos folículos preovulatorios.

OBJETIVOS

Separar las células que participan en la esteroidogénesis en el ovario de pollos recién nacidos.

Cuantificar las hormonas producidas por dichas células y evaluar el efecto que producen las hormonas LH y FSH sobre una población celular ovárica mixta y en subpoblaciones purificadas por un gradiente de densidad.

Identificar y separar las poblaciones celulares encargadas de segregar 17 β -estradiol y testosterona en el tejido techal del ovario adulto.

Cuantificar las hormonas secretadas por dichas poblaciones celulares y evaluar el efecto que producen las gonadotropinas sobre las mismas células.

Describir los cambios que se presentan en los diferentes folículos preovulatorios, relacionando su actividad fisiológica con las características histológicas.

MATERIALES Y METODOS

REACTIVOS UTILIZADOS

Medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) de GIBCO

Tripsina (1:250) GIBCO

Inhibidor de tripsina (SIGMA)

Albumina sérica bovina (BSA) (SIGMA)

1-etil 3-isobutil xantina (MIX) (SIGMA)

Metrizamida (SIGMA)

Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) (SIGMA)

FSH porcina (NIH-FSH-P2) (NATIONAL INSTITUTE OF ARTHRITIS, METABOLIC AND DIGESTIVE DISEASES)

Testosterona (SIGMA)

17 β -estradiol (SIGMA)

Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals)

Anti-testosterona (Radioassay Inc.)

Anti-17 β -estradiol (Radioassay Inc.)

(1,2,6,7-³H) Testosterona (94 Ci/μmol) (Amersham International)

17 β -(2,4,6,7,-³H) estradiol (92 Ci/μmol) (Amersham International)

OBTENCION DE CELULAS OVARICAS EN POLLOS RECIENTE NACIDOS

Se utilizaron pollos recién nacidos (Rhode Island), obtenidos en plantas locales de incubación, los que fueron sacrificados dentro de las primeras 24 horas posteriores a la eclosión. Se diseccionó el ovario izquierdo, se lavó dos veces en solución salina balanceada

libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , para eliminar la sangre acumulada en el tejido. Posteriormente, se hizo una disociación mecánico-enzimática con tripsina (2.5 mg/ml) en solución salina balanceada libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , a 37°C y agitación constante (90 ciclos/min) durante 30 minutos. Se obtuvieron 3 fracciones de células liberadas a los 10, 20 y 30 minutos de incubación, las que fueron lavadas con inhibidor de tripsina (2.5 mg/ml) y posteriormente fueron lavadas dos veces más, con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) adicionado con 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA). En otra serie de experimentos, se disoció completamente el tejido por incubación en tripsina y las células ováricas aisladas y lavadas con inhibidor de tripsina, fueron colocadas en un gradiente continuo de metrizamida de 0 a 30% (Rickwood, et al, 1973), se centrifugaron a $4,000 \times g$ durante 7 minutos después de lo cual se obtuvieron 6 fracciones celulares de 0.4 ml, las que fueron lavadas 2 veces en 10 ml de DMEM con 0.1% de (BSA), para finalmente sembrarlas en el medio de incubación. Se determinó el número de células sembradas en un hemocitómetro y la viabilidad celular por la prueba de exclusión del azul tripán (Tennant, 1964).

Se tomaron alícuotas de las suspensiones celulares obtenidas por gradiente de metrizamida o de las células que se obtuvieron de los diferentes tiempos de disociación con tripsina y se incubaron en DMEM + BSA (0.1%) + isobutil-metil-xantina (IBMX) 0.1 mM. a 37°C en un baño con agitación (90 ciclos/min) y bajo una atmósfera de 95% de aire y 5% CO_2 , el tiempo de incubación fue de 120 minutos, excepto en los experimentos para establecer la cinética.

En los grupos experimentales estimulados con hormona gonadotropina corionica humana (HCG) y FSH, estas hormonas fueron disueltas en el medio de incubación. Posteriormente a la incubación se tomaron muestras para cuantificar la concentración de 17 β -estradiol y testosterona por medio de radioinmunoanálisis.

ESTUDIOS DE ULTRAESTRUCTURA

Para estudios de la ultraestructura de las células ováricas obtenidas en las distintas fracciones, las suspensiones fueron fijadas en glutaraldehído al 2% en amortiguador de fosfatos (0.15M) a pH 7.4, seguida de una postfixación con tetroxido de osmio (1%). Los cortes finos fueron obtenidos en un ultramicrotomo Reichert y contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1963). Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico Zeiss EM9-S2.

EXPERIMENTOS CON ANIMALES ADULTOS

Se realizaron otra serie de experimentos en tejido tecal de gallinas adultas Leghorn (cepa Babcock B300), de 48 a 52 semanas de edad, a las que previamente se les controló la oviposición, se sacrificaron por dislocación cervical, aproximadamente de 6 a 8 horas después de la ovulación. Se obtuvieron los folículos preovulatorios y se clasificaron de F1 a F6, en orden decreciente de tamaño y el tejido tecal de cada uno de los mismos, fue separado completamente de la capa granulosa por el método descrito por Gilbert et al (1971). La teca de cada uno de los folículos fue lavada tres veces en solución salina libre de Ca²⁺ y Mg²⁺, y se eliminó además la gruesa capa de tejido conjuntivo que rodea al tejido tecal. El tiempo apropiado para obtener una suspensión

celular completa del tejido fue de 30 minutos en tripsina (0.25%), posteriormente se elimino el efecto enzimático con dos lavados de DMEM con inhibidor de tripsina. Se incubaron aproximadamente 0.5×10^6 células/mlilitro. De cada folículo se determinó por medio de radioinmunoanálisis la cantidad producida de 17 β -estradiol y testosterona en condiciones basales y estimuladas con hCG (2 U I /ml). El tejido tecal de un folículo pequeño (F5), fue sometido a una disociación mecánico-enzimática con tripsina al 0.25%, en solución salina isotónica libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} en dos periodos de 15 minutos cada uno y a las fracciones obtenidas se les denominó F15 y F30 respectivamente, después de la disociación, ambas fracciones fueron lavadas 2 veces con inhibidor de tripsina (2.5 mg/ml), posteriormente, se determinó el número y la viabilidad celular por el método descrito anteriormente para las células obtenidas de ovarios de pollos recién nacidos. Se incubaron aproximadamente 0.5×10^6 células por mililitro en DMEM-IBMX en una atmosfera de 95% aire y 5% CO₂ en agitación constante (90 ciclos/min) a 37 ° C. Se cuantifico la secreción de 17 β -estradiol y testosterona. Con la intención de purificar poblaciones celulares esteroideogénicas a partir del tejido tecal disociado, se hizo un gradiente de Metrizanida (0 a 30%), se obtuvieron 4 subpoblaciones celulares, a las que se les determinó la capacidad de secreción de 17 β -estradiol y testosterona en condiciones basales y estimuladas con hCG, después de dos horas de incubación, en las mismas condiciones arriba descritas.

PORCENTAJES DE REACCION CRUZADA PARA LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS
(ANTI-TESTOSTERONA Y ANTI-17 β -ESTRADIOL)

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

CURVAS PATRON Y COEFICIENTES DE VARIACION DEL RADIOINMUNOANALISIS

Se utilizaron las curvas estandar de cuatro radioinmunoanalisis para calcular los coeficientes de variación, la figura 1. representa la curva estandar de los radioinmunoanalisis 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 intraensayo de 4.6%.

La figura 2, representa la curva estandar de estradiol y su coeficiente de variación es de 11.03% y el coeficiente de variación intraensayo es de 4.9%, por lo que se consideran modelos confiables y reproducibles.

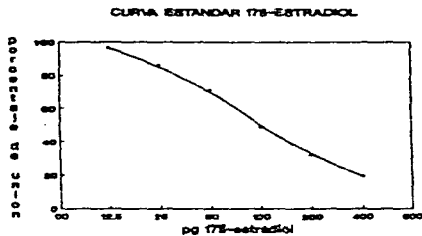
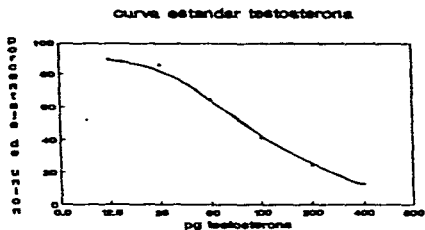


Fig. 1. Curva estandar de testosterona, se observa el porcentaje de unión del anticuerpo en las diferentes concentraciones de testosterona, en una hora de incubación.

Fig. 2. Curva estandar de 17 β -estradiol, se observa el porcentaje de unión del anticuerpo en las diferentes concentraciones de 17 β -estradiol, en una hora de incubación.

RESULTADOS

PRODUCCION DE ANDROGENOS Y ESTROGENOS POR EL OVARIO DE AVES RECIEN NACIDAS

Al disociar mecánico-enzimáticamente los ovarios de pollos recién nacidos, y cosechar las células liberadas a intervalos de 10 minutos, se reconocen diferentes tipos celulares. Estos tipos celulares se clasifican de acuerdo a sus características morfológicas en: a) Células con vacuolas lipídicas claramente distinguibles y un diámetro aproximado de 20µm, b) Células con un núcleo de cromatina semicondensada sin vacuolas lipídicas y ligeramente de menor tamaño que las del primer tipo y c) Células con núcleo grande, excéntrico, de cromatina semicondensada y con un tamaño cercano a las 30µm, estas últimas corresponden a ovocitos primarios.

La proporción de los tres tipos celulares cambia en las fracciones obtenidas entre los 10 y los 30 minutos de disociación enzimática (Tabla I).

TABLA I. PORCENTAJE DE TIPOS CELULARES EN FRACCIONES OBTENIDAS A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION CON TRIPSINA.

	Con Lipidos	sin Lipidos	Ovocitos
10 minutos	1.21	77.4	21.3
20 minutos	8.17	86.5	5.24
30 minutos	14.20	83.0	2.68

El mayor porcentaje de ovocitos se obtiene en la primera fracción, y se reduce considerablemente en segunda y la última, mientras que se observa un fenómeno inverso en cuanto a la

concentración de células con inclusiones lipídicas, pues el mayor porcentaje de estas, se encuentra a los 30 minutos de tratamiento enzimático. Los estudios histológicos de fragmentos de ovario recolectados a diferentes tiempos, muestran que la corteza ovárica se disgrega en los primeros minutos de tratamiento enzimático, a los 20 minutos de incubación queda fundamentalmente la médula ovárica. La fracción celular obtenida a los treinta minutos de tratamiento enzimático, mantiene los niveles más altos en cuanto a la producción de estradiol se refiere (Fig.1), por lo cual todos los experimentos, realizados en este trabajo, se hicieron con esta fracción celular.

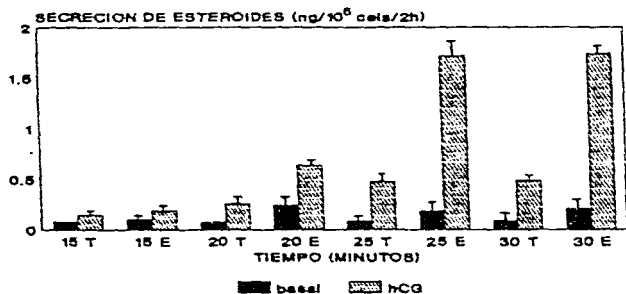


Fig. 1. Secreción de testosterona y 17 β -estradiol en células obtenidas a diferentes tiempos de disociación con tripsina en condiciones basales y estimuladas con hCG (2 u/ml).

En la curva de dosis-respuesta a hCG de las células ováricas disociadas con tripsina en 30 minutos (Fig.2), evaluada por la secreción de estradiol y testosterona, se obtiene una DE_{50} hCG de 0.3 UI/ml para estradiol, mientras que para testosterona es de 0.68 UI/ml.

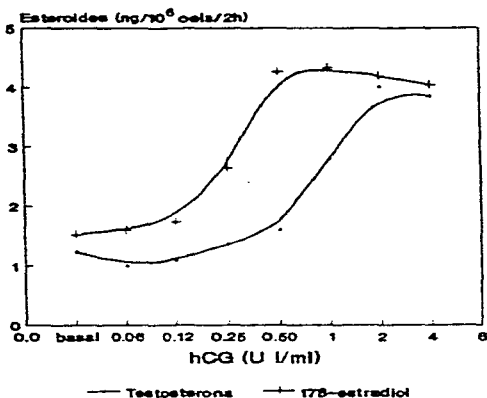


Fig. 2. Curva de dosis-respuesta a hCG en células ováricas obtenidas a los 30 minutos de disociación con tripsina, valorada con la secreción de 17β-estradiol (+) y testosterona (a).

Al estimular la población celular mixta, previa a la separación por gradiente de densidad, con hormona foliculo estimulante (FSH), se obtiene un incremento en la secreción de testosterona y de 17 β -estradiol con respecto a las células en condiciones basales, este efecto, evaluado por medio de curvas de dosis-respuesta a FSH, da como resultado una DE₅₀ FSH de 27 ng/ml para 17 β -estradiol, mientras que para estimular la secreción de testosterona, la DE₅₀FSH es 107 ng/ml (Fig. 3A).

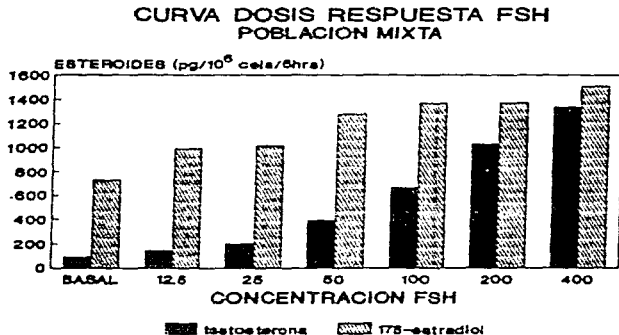


Fig. 3A. Curva de dosis-respuesta a FSH en una población mixta, de ovarios de pollitas recién nacidas.

En la curva de tiempo para FSH (Fig. 3B), al cuantificar la secreción de andrógenos y estrógenos, se observa que la concentración de testosterona, comienza a reducirse a partir de las 6 horas de incubación, mientras que, la curva de 17 β -estradiol tiene un incremento lineal hasta las 8 horas de incubación. (Fig. 3B).

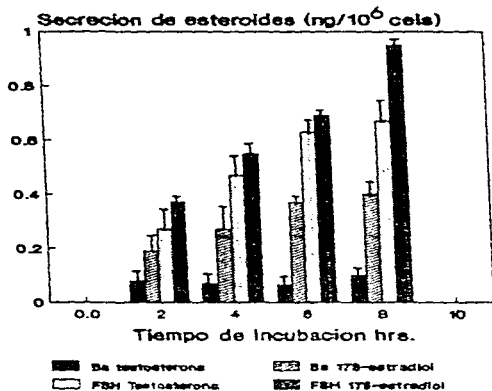


Fig. 3B. Efecto de FSH (100 ng/ml), sobre la producción de 17 β -estradiol y testosterona, en una población mixta ovárica obtenida por disociación mecánico-enzimática, durante 8 horas de incubación.

Para determinar si el incremento en la secreción de andrógenos y estrógenos, se produjo por contaminación de LH en la FSH de trabajo, se utilizó un ensayo biológico con células de Leydig (Fig. 4) obtenidas de testículo de rata adulta. Se comprobó que la concentración utilizada de FSH (100 ng/ml), no produce ningún estímulo en la secreción de testosterona, con respecto a las condiciones basales. Como testigo positivo se utilizaron células estimuladas con hormona gonadotropina coriónica humana

EFFECTO DE FSH Y hCG CELULAS DE LEYDIG

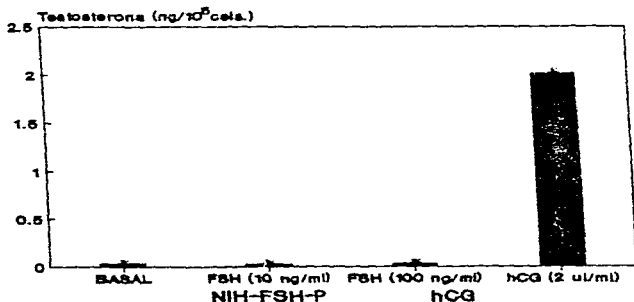


Fig. 4. Efecto de FSH y hCG en un bioensayo de células de Leydig de rata adulta, obtenidas por tratamiento enzimático con tripsina, e incubadas 2 horas a 37 °C, con una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. La secreción de testosterona se cuantificó como se describe en materiales y métodos.

Al separar las células medulares ováricas en un gradiente de metrizasida (0 a 30%), se obtienen cinco bandas de células y una banda, que corresponde a la fracción de los eritrocitos (Fig.5). La fracción II, se caracteriza por presentar sólo células con gotas lipídicas, mientras que en la fracción VI, predominan las células sin lípidos (97%) con sólo un 3% de células con inclusiones lipídicas en la misma. La mayor concentración de ovocitos se encuentra en la fracción IV .

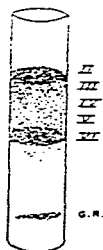


Fig. 5. Distribución en un gradiente de metrizasida (0 a 30%), de la población celular ovárica obtenida a los 30 minutos de tratamiento con tripsina.

Las características ultraestructurales de las células de la fracción II son: Mitochondrias con crestas tubulares, abundantes vesículas de retículo endoplasmático liso (REL), y abundantes gotas de lípidos (Fig.6).



Fig. 6. Características ultraestructurales de las células presentes en la fracción II, obtenidas por un gradiente de metrizamida (0 a 30%), en el citoplasma se pueden observar vacuolas lipídicas de diferente tamaño y mitochondrias con crestas tubulares 44,000 X.

Las células de la fracción VI (Fig. 7), se caracterizan por la presencia de mitocondrias con crestas laminares, polirribosomas en el citoplasma y retículo endoplásmico rugoso (RER) poco desarrollado, este tipo celular constituye el 84% de la fracción VI. En esta misma fracción se pueden encontrar células pregranulosas (3%), que se caracterizan por la presencia de cuerpos de recubrimiento (lining bodies) en su citoplasma. Además se identifican algunas células con características ultraestructurales de la fracción II (3%) y un 10% de células con múltiples prolongaciones citoplásmicas que corresponden a fibroblastos.



Fig. 7. Características ultraestructurales de las células más abundantes en la fracción VI, obtenidas en un gradiente de metrizamida, nótese la ausencia de lípidos en el citoplasma y el aspecto de célula poco diferenciada 37,000 x.

A cada fracción obtenida por el gradiente de densidad, se le cuantificó la secreción de estradiol y testosterona (Fig. 8), se encontró que el valor máximo para el 17 β -estradiol se localiza en la fracción VI, y que la mayor secreción de testosterona se encuentra en la fracción II.

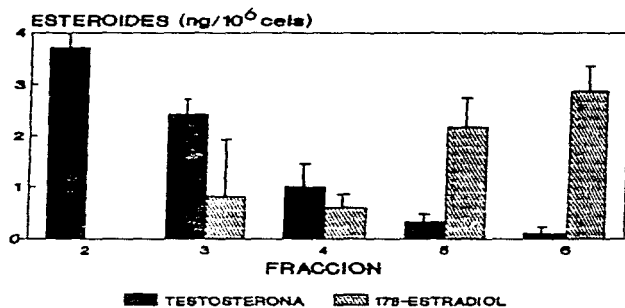


Fig. 8 Secreción de 17 β -estradiol y testosterona por las diferentes fracciones celulares ováricas obtenidas por un gradiente de densidad a las 2 horas de incubación (Raza Leghorn).

En poblaciones purificadas por gradiente de densidad, se encuentra que el tratamiento con hCG (2 U I /ml), durante 2 horas de incubación, produce en la fracción II, un aumento en la secreción de testosterona (Fig. 9A). Además en la fracción VI, la hCG estimula la secreción de estradiol (Fig. 9B). Por otro lado las poblaciones celulares antes mencionadas responden a un estímulo de FSH (100 ng/ ml), incrementándose la producción de andrógenos en la fracción II y de 17 β -estradiol en la fracción VI (Fig. 10A, 10B).

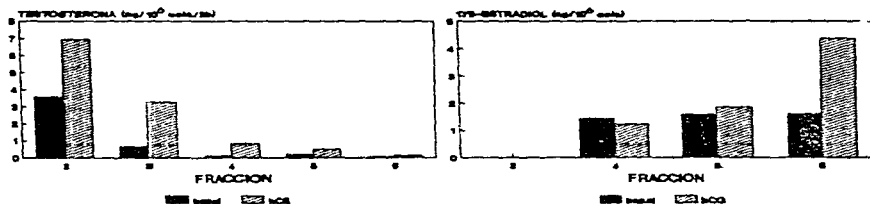


Fig. 9A. Secreción de testosterona por las diferentes subpoblaciones celulares ováricas, obtenidas por un gradiente de densidad y estimuladas con hCG (Pollitas Rhode island).

Fig. 9B. Secreción de 17 β -estradiol por las mismas subpoblaciones celulares ováricas y estimuladas con hCG.

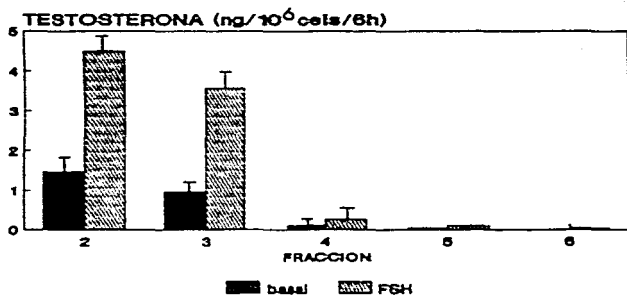


Fig. 10A. Secreción de testosterona en subpoblaciones celulares obtenidas por un gradiente de densidad y estimuladas con FSH (100 μ g/ml).

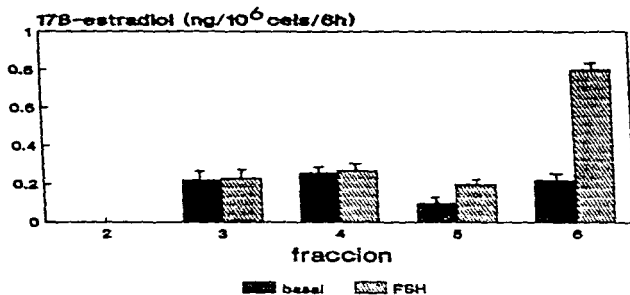


Fig. 10 B. Secreción de 17 β -estradiol en subpoblaciones celulares, obtenidas por un gradiente de estrizaida y estimuladas con FSH, durante 6 horas de incubación.

SECRECIÓN DE ESTRADIOL Y TESTOSTERONA POR LA TECA DE OVARIOS DE SALLINAS

Cuando se analizó el tejido tecal de los folículos preovulatorios de gallinas, aislado de la capa granulosa, se observaron diferencias en la secreción de 17 β -estradiol y testosterona, dependiendo del tamaño folicular.

La cantidad de 17 β -estradiol producida por el tejido tecal, se encontró solamente en los folículos más pequeños F4 a F6 (Fig. 11A). El estímulo con hCG produjo un incremento considerable en la producción de estrógenos. En los folículos mayores (F3 a F1), no se cuantificó secreción de 17 β -estradiol en condiciones basales ni cuando se estimuló con hCG.

La cantidad de testosterona producida por la teca folicular, separada de la capa granulosa de los folículos preovulatorios F6 a F1 (Fig. 11B), se detecta desde el F6 hasta el F2 en condiciones basales y estimuladas con hCG, se encontró la máxima producción estimulada en los folículos más pequeños F6 y F5. El folículo más grande (F1), no produce cantidades medibles de testosterona.

Con el tejido tecal de (F5) disociado durante dos tiempos diferentes de tripsina (15 y 30 minutos), se obtienen dos fracciones celulares denominadas F₁₅ y F₃₀ respectivamente, al estimular estas poblaciones celulares con hCG, en las condiciones descritas en materiales y métodos las células de la F₁₅ producen niveles altos de testosterona, mientras que en esta fracción celular no se detectaron cantidades medibles de 17 β -estradiol. En la fracción obtenida a los 30 minutos de tripsinización (F₃₀) se

encontraron los niveles mas altos de estrógenos (Fig 12).

Al procesar la población de células obtenidas de la teca, por un gradiente de estrizaida (0 a 30%), se obtienen 4 sub-poblaciones celulares (Fig. 13), una población con una densidad de 1.040 gr/ml. secretora de testosterona y una segunda población con una densidad de 1.068 gr/ml secretora de 17 β -estradiol.

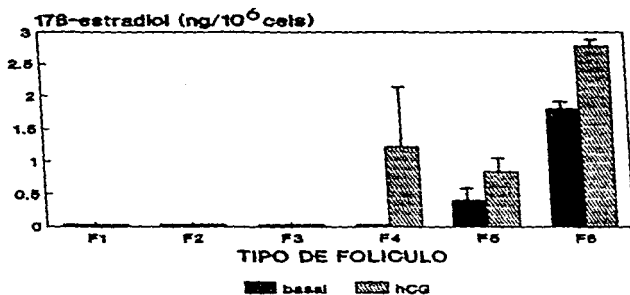


Fig. 11A. Secreción de 17 β -estradiol por las células esteroidogénicas de la teca de aves, separadas de la capa granulosa, de 6 diferentes folículos prevulatorios (F1 a F6) en orden decreciente de tamaño, en condiciones basales y estimuladas con hCG durante 2 horas de incubación.

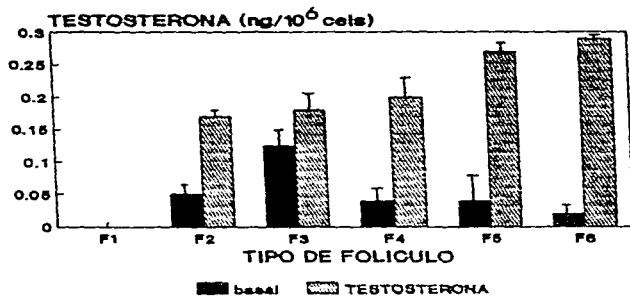


Fig. 11B. Secreción de testosterona por las células de la teca, separadas de la capa granulosa, de 6 diferentes folículos preovulatorios (F1 a F6) en orden decreciente de tamaño, la secreción se cuantificó en condiciones basales y estimuladas con hCG durante 2 horas de incubación.

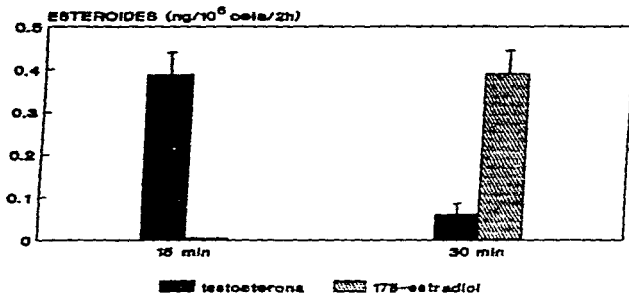


Fig. 12. Producción de andrógenos y estrógenos por células de la teca de aves, obtenidas a los 15 y 30 minutos de disociación con tripsina, a las 2 horas de incubación. (▨ 17β-estradiol) (■ testosterona).

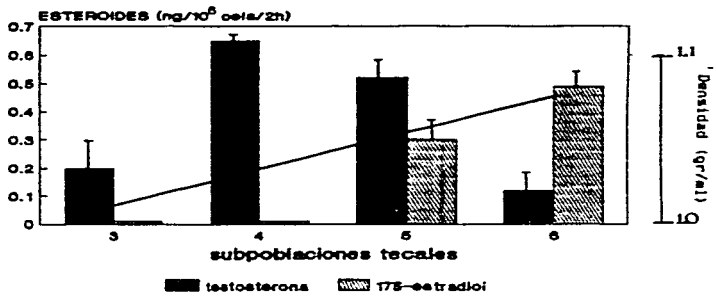


Fig. 13. Produccion de testosterona y 17β-estradiol en subpoblaciones celulares tecales, obtenidas con base en su diferente densidad en un gradiente de metrizamida, a las 2 horas de incubacion. (▨ 17β-estradiol) (■ testosterona).

DISCUSION

La suspensión celular obtenida después de la disociación mecánico enzimática del ovario de aves recién nacidas, segrega 17 β -estradiol y testosterona en el medio de incubación y se observa una correlación entre la secreción de estas hormonas con la dosis de gonadotropinas (HCG Y FSH) administrada exógenamente, así como con el tiempo de incubación. Estos hechos sumados a la prueba de viabilidad celular, comprueban que las células obtenidas después de la disociación con tripsina mantienen sus características funcionales, y se puede descartar un daño a nivel de los receptores del plasmalema como consecuencia del método utilizado para aislar las células.

Se considera que las células obtenidas fueron principalmente de la médula ovárica, esto se puede afirmar con base en la disminución del número de células germinales que se presentan en la fracción utilizada en los estudios. Sin embargo no se puede descartar que exista en la misma un bajo porcentaje de células de la corteza ovárica.

En la población celular mixta, se usa esta denominación para referirse a las células obtenidas luego de la disociación y sin ser separadas por el gradiente de metrizamida, se observa un incremento en la producción de 17 β -estradiol y testosterona al administrar FSH, con respecto a las condiciones basales.

Aunque no se eliminó la probable contaminación de LH por medio de anticuerpos específicos como se ha hecho en otros reportes (Ritzhaupt y Bahr, 1987). Se puede descartar la presencia

de un efecto de LH en la FSH utilizada ya que la dosis empleada no produjo ningún estímulo en un bioensayo con células de Leydig de rata adulta. Estos resultados concuerdan con los reportados por Teng y Teng (1979), pues con un modelo similar, al incubar ovarios de 15 días de desarrollo, logra estimular la esteroidogénesis con LH y FSH.

Se considera que la hormona que fundamentalmente estimula la esteroidogénesis en las aves es la LH (Maung y Follet, 1977), sin embargo la FSH también tiene efecto sobre la secreción de hormonas esteroides en ovario de embriones de pollo, o en ovarios de aves recién nacidas.

En poblaciones de células purificadas por gradiente de metrizada, se encuentra que en la fracción de menor densidad, se produce la máxima secreción de testosterona. Las características ultraestructurales de las células de esta fracción son: Reticulo endoplásmico liso (REL) bien desarrollado, mitocondrias con crestas tubulares e inclusiones lipídicas en el citoplasma, estructura que corresponde a células esteroidogénicas, que han sido descritas en el ovario de embriones de pollo (Narbaitz y Adler, 1966; Jordanov et al 1978). Estas células presentan además reacción positiva para la 3 β -HSD (Pedernera et al 1988), lo cual sugiere la capacidad de síntesis de hormonas esteroides, ya que esta enzima oxida los 3 β -hidroxil-esteroides a ceto-esteroides, paso fundamental requerido en la síntesis de prácticamente todas las sustancias esteroides con actividad hormonal (Baillé et al, 1966). Al incubar las células de la fracción II con testosterona tritiada, se obtuvo androsterodiona, como uno de los metabolitos más importante lo que nos indica actividad de 17 β -HSD (Pedernera,

et al 1988) . Por otra parte, no se detectaron estrógenos por RIA en esta subpoblación ovárica. Estos resultados permiten considerar que las células esteroidogénicas descritas por González del Pliego et al en 1985, presentes en la médula de ovarios de pollos recién nacidos, secretan andrógenos pero no estrógenos.

La fracción VI obtenida por el gradiente de densidad, compuesta por células de mayor densidad, se caracterizó por segregarse los niveles más altos de 17β -estradiol y por consiguiente fue la fracción con mayor capacidad de aromatización de andrógenos (Fig. B), cabe mencionar que esta fracción celular no está constituida por un solo tipo de células, pues en ella se encuentran: a) células prefolliculares, b) células esteroidogénicas típicas, c) células con aspecto relativamente indiferenciado y d) fibroblastos. Las células prefolliculares fueron reconocidas por la presencia de cuerpos de recubrimiento (lining bodies) en el plasmalema (Rahil y Narbaitz 1972, Carlon y Erickson 1978) y representaron solo el 2% de la fracción VI, estas células son características de la zona cortical y difícilmente se les podría atribuir la secreción de estradiol, ya que al incubar la fracción de células que corresponde a la corteza ovárica, no se cuantificó secreción de estrógenos o andrógenos. Además, las células prefolliculares originan a las células de la granulosa en los folículos del ovario adulto y estas células en las aves, a diferencia de los mamíferos, no secretan 17β -estradiol (Huang y Malvandov 1979 a,b). El porcentaje de células esteroidogénicas típicas presentes en esta fracción celular es de tan solo 3 a 5%. Es importante destacar que no se encontró relación entre el

porcentaje de este tipo celular y los niveles de estradiol que se producen. Las evidencias hasta aquí obtenidas, sugieren que de los tipos celulares presentes en la fracción VI, la población de células con aspecto relativamente indiferenciado y que además representan el 85% de la fracción, sea la secretora de estradiol. Estudios previos de nuestro laboratorio (González del Pliego et al, 1988), reportaron un componente epitelial en la médula ovárica, con dos tipos celulares perfectamente reconocidos que son : a) células esteroideogénicas típicas y b) células de aspecto indiferenciado. Las primeras ocupan solo el 18% de la médula ovárica, mientras que las segundas son el componente principal de la médula ovárica (González-Moran, et al 1985). En el presente trabajo, la presencia de dos poblaciones celulares con función diferente en cuanto a secreción de hormonas esteroideas y la cuantificación de su secreción, sugieren que las células esteroideogénicas típicas segregan andrógenos y que las células de aspecto relativamente indiferenciado son probablemente la fuente de estrógenos (Pedernera et al, 1988).

Como se ha mencionado anteriormente la población celular mixta del ovario presenta estimulación de su secreción de testosterona y 17 β -estradiol, con la hormona FSH. Cuando se trabaja con poblaciones purificadas, la fracción II que tiene las características típicas de una célula esteroideogénica y es secretora de testosterona puede ser estimulada por FSH. Esto es de suma importancia ya que hasta donde sabemos, no existen reportes en mamíferos o en aves en los que la FSH produzca este estímulo en una población purificada que segrega andrógenos preferentemente. Esto sugiere la presencia de receptores para LH y FSH en este tipo

Celular.

La producción de andrógenos y estrógenos medidos en el tejido tecal de los folículos preovulatorios de gallina, confirma resultados previamente reportados, donde con modelos similares, se demuestra que en los folículos más pequeños existe la mayor concentración de 17 β -estradiol y testosterona (Nakamura et al, 1979; Porter y El Halawani, 1987).

Las diferencias con los otros estudios son que, en nuestro modelo experimental no se agregaron precursores exógenos como progesterona o androstenediona, al medio de incubación de las células tecales obtenidas por la disociación enzimática. Además las células de la teca responden al estímulo con hCG, con un incremento en la producción de testosterona y 17 β -estradiol. Es importante mencionar que en nuestro modelo, aunque la producción de andrógenos aromatizables, se detecta desde el folículo más pequeño (F₀) hasta el folículo (F₂), la producción de 17 β -estradiol solamente se detecta en los tres folículos más pequeños (F₃ a F₄). Esto se puede explicar por una disminución de receptores a hCG, en la teca de los folículos más grandes, porque la capacidad de aromatización sea menor a medida que el folículo madure (Armstrong, 1984), o por una desviación en el metabolismo de los andrógenos, que de como resultado andrógenos 5 α -reducidos y que estos a su vez funcionen como un factor inhibitor de las aromatasa como se ha demostrado en mamíferos (Siiteri y Thompson 1975).

Al considerar que las células que segregan testosterona, en el tejido tecal de un folículo pequeño (F₃), se colectaron a los 15

minutos de tripsinización y mediante el análisis de los controles histológicos del tejido disociado, podemos proponer que las células productoras de andrógenos, se encuentran en la teca interna y que además al procesarlas en un gradiente de metrizamida, se localizan en la subpoblación celular de menor densidad, las características ultraestructurales que presentan las células antes mencionadas concuerdan con las reportadas por Dahl (1971 a,b,c).

En lo referente a las células productoras de 17 β -estradiol, podemos argumentar que se localizan en la teca externa, ya que el tiempo requerido para disociar la teca externa fue de 30 minutos y además la producción máxima de 17 β -estradiol también se encontró a los 30 minutos de tratamiento enzimático.

Las células disociadas de la teca del folículo (F5) y centrifugadas en un gradiente de metrizamida, dan como resultado, subpoblaciones celulares con actividad esteroideogénica diferente, las células que producen testosterona, tienen una densidad de (1.040 gr/el) mientras que las células que segregan 17 β -estradiol, presentan una densidad de (1.088 gr/el), esto sugiere la presencia de por lo menos dos poblaciones celulares, que están presentes en el tejido tecal y que difieren en la actividad esteroideogénica, estos resultados coinciden con los obtenidos en pollitas recién nacidas, lo que permite proponer que en la biosíntesis de testosterona y 17 β -estradiol en el ovario de aves participan dos poblaciones celulares.

Al analizar la teoría bicelular, que plantea la necesidad de que dos poblaciones celulares diferentes, participen en la producción de 17 β -estradiol por un lado y de andrógenos aromatizables por otro, encontramos que se puede aplicar tanto al

ovario de las aves como al de los mamíferos, al margen de la distribución que las mismas tengan en el folículo.

Otro hecho que se desprende de nuestros estudios, es que estas poblaciones celulares, ya están diferenciadas en ovarios inmaduros, antes de la formación de los folículos.

En el tejido tecal del ovario de aves se producen andrógenos y estrógenos, pero es importante mencionar que en el ovario de algunos mamíferos como en el hombre (Ryan et al, 1968; Channing y Grieves, 1969; Batta et al, 1980), en monos (Channing et al, 1978), en yegua (Ryan y Short 1965; Channing y Grieves 1969), en vacas (Lacroix et al, 1974), en hamster (Makris y Ryan 1975), en oveja (Armstrong et al, 1981) y cerdos (Evans et al, 1981), el tejido tecal es capaz de aromatizar andrógenos, aunque la producción de 17 β -estradiol a partir de estos andrógenos aromatizables, sea considerablemente menor que en la granulosa. Resultaría interesante considerar si en la teca folicular de los mamíferos antes mencionados, participan más de una población de células de la teca en la esteroidogénesis, es decir que una población celular sea la productora de andrógenos y otra con características morfofuncionales diferentes, sea la encargada de la aromatización de los mismos.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos podemos concluir que:

En la región de la médula de ovarios de pollos recién nacidos, se producen los niveles más altos de testosterona y 17 β -estradiol. Las hormonas HCG y FSH producen un estímulo en las células de la médula ovárica, que aumenta la secreción de testosterona y 17 β -estradiol.

Se pueden separar poblaciones celulares con características morfofuncionales diferentes, las células encargadas de la secreción de andrógenos, presentan la ultraestructura que caracteriza a las células esteroidogénicas típicas, mientras que las células encargadas de la secreción de estradiol mantienen una ultraestructura poco diferenciada. Estas dos poblaciones celulares tienen la capacidad de responder tanto a la HCG como a la FSH con un incremento en la producción de andrógenos y estrógenos.

El tejido tecal del folículo preovulatorio de gallina produce testosterona y 17 β -estradiol además responde a un estímulo de HCG, con un aumento de su secreción.

En los folículos preovulatorios de aves adultas, existe una relación inversa entre el grado de maduración folicular y la producción de andrógenos y estrógenos en la teca folicular.

Las células tecales aisladas y separadas en un gradiente de densidad demuestran que existe una compartimentalización funcional. La población con una densidad menor localizada en la teca interna, produce solamente andrógenos y la población celular de mayor densidad se caracteriza por producir 17 β -estradiol.

ESTA TESIS NO DEBE
CALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

- Arrestron, D.G., Maida F. Davison., A.B. Gilbert y J.W. Wells. (1977). Activity of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the postovulatory follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J Reprod Fert* 49:252-259.
- Arrestron, D.G. (1981). 3 β -Hydroxy-Steroid deshydrogenase activity in rapidly growing ovarian follicles of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J Endocr* 93:415-421.
- Arrestron, D.G. (1984). Ovarian aromatase activity in the domestic fowl. *J Endocr* 100:81-86.
- Arrestron, D.G. (1985). Changes in aromatase activity in small ovarian follicles of the domestic fowl (*Gallus domesticus*) during growth and atresia. *J Endocr* 105:297-301.
- Bahr, J.M., Wang, S.C., Huang, M.Y., y Calvo, F.O. (1983). Steroid concentrations in isolated theca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen. *Biol Reprod* 29:326-334.
- Baile, A.M., Ferguson, M.M. y D. Mck. Hart. (1966). Development in steroid histochemistry. New York, Academic Press.
- Batta, S.K., Kentz, A.C., y Channing, C.P. (1980). Steroidogenesis by human ovarian cell types in culture. Influence of mixing of cell types and effect of added testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 50:274-279.
- Benoit, J. (1926). Sur L'origine des cellules intersticielles de L'ovaire de la poule. *C R Soc Biol* 94:873-875.
- Benoit, J. (1950). Differentiation sexuelle chez les oiseaux au cours du developement normal et de l'intersexualite experimentale par ovariectomie. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 39:395-414.
- Brodie, M.D. (1928). The significance of the asymetry of the ovaries of the fowl. *J Morphol Physiol* 46:1-57.
- Budras, K.D., y Preus, F. (1973). Elektronenmikroskopische untersuchungen zur embryonalen und postembryonalen genese der eierstockzwischenzellen des haushuhnes. *Z Zellforsch* 136:59-83.
- Byskov, A.G., Skakkebaek, N.E., Stafanger, G., y Peters, H. (1977). Influence of ovarian surface epithelium and rete ovarii on follicle formation. *J Anat* 123:77-86.

Carlson, N., y Erickson, G.F. (1978). Fine structure of pre-follicular and developing germ-cells in male and female left embryonic gonads in vitro with and without androgenic steroids. *Ann Biol Anim Bioch Biophys* 18:335-349.

Channing, C.P., y Grievos, S.A. (1969). Studies on tissue culture of equine ovarian cell types: Steroidogenesis. *J Endocr* 43:391-402.

Channing, C.P., Wentz, A.C., and Jones, G. (1978). Steroid secretion by monkey and human ovarian cell types in vivo and in vitro. In Symposium on the ovary held in Fresnes, France, edited by R. Scholler, pp. 71-86. Editions Sepe, Paris.

Cuatrecasas, P. (1974). Membrane receptors. *Ann Rev Biochem* 43:169-214.

Dahl, E. (1970). Studies of the fine structure of ovarian interstitial tissue 2. The ultrastructure of the thecal gland of the domestic fowl. *Z Zellforsch* 109:195-211.

Dahl, E. (1971 a). Fine structure of the granulosa cells in the domestic fowl and the rat. *Z Zellforsch* 119:58-67.

Dahl, E. (1971 b). Studies of the fine structure of ovarian interstitial tissue. 3. Effects of gonadotropins on the thecal gland of domestic fowl. *Z Zellforsch* 113:133-156.

Dahl, E. (1971 c). Studies of the fine structure of ovarian interstitial tissue 1. A comparative study of the fine structure of the ovarian interstitial tissue in the rat and the domestic fowl. *J Anat* 108:275-290.

Davison, M.F., Gilbert, A.B. y Wells, J.W. (1979). The activity of the ovarian 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the domestic fowl (*Gallus domesticus*), with respect to age. *J Reprod Fert* 57:61-64.

Dick, H.R., Culbert, J., Wells, J.W., Gilbert, A.B. y Davidson, M.F. (1978). Steroid hormones in the postovulatory follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J Reprod Fert* 53:103-107.

Erickson, G.F., y A.J.W. Hsueh. (1978). Stimulation of aromatase activity by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocr* 102:1275-1283.

Etches, R.J., y Cheng, K.W. (1981). Changes in the plasma concentrations of lutealizing hormone, progesterone, oestradiol and testosterone and in the binding of follicle stimulating hormone to the teca of follicles during the ovulation cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *J Endocr* 91:11-22.

Evans, G., Dobias, M., King, G.J., y Armstrong, D.T. (1981). Estrogen, androgen, and progesterone biosynthesis by theca and granulosa of preovulatory follicles in the pig. *Biol Reprod*

25:673-682.

Fell, H.B. (1924). Histological studies on the gonads of the fowl. II. The histogenesis of the so called luteal cells of the ovary. *Brit J Exp Biol* 1:293-311.

Furr, D.J. A., Bonney, R.C., England, R.J., y Cunningham, F.J. (1973): Luteinizing hormone and progesterone in peripheral blood during the ovulatory cycle of the hen, *Gallus domesticus*. *J Endocr* 36:159-169.

Galli, F.E. y Wassermann, G.F. (1973). Steroid biosynthesis by gonads of 7- and 10- old chick embryos. *Gen Comp Endocr* 21: 77-83.

Gallien, L. (1973). *Differentiation et organogenèse sexuelle des métazoaires*. Masson, Paris.

Gilbert, A.B. (1971). The endocrine ovary. In *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. (D.J. Bell and B.M. Freeman, eds). 3:1449-1468. Academic Press, London.

Gilbert, A.B., Evans, A.J., Perry, M.M., y Davison, M.H. (1977). A method for separating the granulosa cells, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J Reprod Fert* 50:179-181.

Gilbert, A.B. (1979). Female genital organs. In *form and function in birds*, p.p. 273-360. Eds. A.S. King y J. Mclelland. London: Academic Press.

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

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

Guichard, A., Cedard, L., y Haffen, K. (1973a). 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 précurseur radioactifs). *Gen Comp Endocr* 20:16-28.

Guichard, A., Cedard, L. y Haffen, K. (1973b). Métabolisme de la prégnenolone et de la progesterone radioactive par les gonades embryonnaires de caille (*Coturnix coturnix japonica*) en culture organotypique. *Gen Comp Endocrinol* 21:478-484.

Guichard, A., Cedard, L., Mignot, Th.-M., Schaub, D., y Haffen, K. (1977). Radioimmunoassay of steroid produced by cultured chick embryonic gonads: Differences according to age, sex, and side. *Gen Comp Endocr* 32:255-265.

- Guichard, A., Haffen K., Cedard, L., Mignot, Th.-M., y Scheib, D. (1979). Effects of hCG and of season on in vitro steroidogenesis by 18-day chick embryo gonads. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 19:1317-1325.
- Hadjiloeff, A.I. (1969): Le developpement et la structure de l'ovaire chez les mammiferes du point de vue d'une theorie du tissu sexuel. 54 Congress Assoc Anat., Sofia, 30 mars-3 avril. Rapport gen., Ed. Acad Bulg Sci 1-59.
- Hammond, R.W., Todd, H. y Hertelendy, F. (1978). Effect of bovine LH on steroidogenesis in avian granulosa cells. *IRCS* 6, 452.
- Hammond, R.W., Todd, H., y Hertelendy, F. (1980). Effect of mammalian gonadotropins on progesterone release and cyclic nucleotide production by isolated avian granulosa cells. *Gen Comp Endocr* 41:467-476.
- Huang, E., y Nalvandov, A.V. (1979). Steroidogenesis of chicken granulosa and theca cells: in vitro incubation system. *Biol Reprod* 20:442-453.
- Huang, E., K. J. Kao y Nalvandov, A.V. (1979). Synthesis of sex steroids by cellular components of chicken follicles. *Biol Reprod* 20:454-461.
- Johnson, A.L., y Van Tienhoven, A. (1980). Plasma concentrations of sex steroids and LH during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *Biol Reprod* 23:386-393.
- Johnson, A.L., y Van Tienhoven, A. (1981). Pharmacokinetics of oestradiol-17 β in the laying hen. *Poultry Science* 60:2720-2723.
- Jordanov, J., Angelova, P., Boyadjieva-Michailova, A., y 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.
- Jost, A. (1970). Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. In *Discussion on determination of sex*. *Phil Trans Roy Soc London B* 259:199-130.
- Lacroix, E., Echaute, W., y Leusen, I. (1974). The biosynthesis of oestrogens by cow follicles. *Steroids* 23:337-356.
- Lange, P.C., Van Tienhoven, A., y Cunningham, F.J. (1975): Concentrations of estrogens, progesterone and LH during the ovulatory cycle of the laying chicken (*Gallus domesticus*). *Biol Reprod* 12:590-598.
- Makris, A., y Ryan, K.J. (1975). Progesterone, androstenedione, testosterone, estrone and estradiol synthesis in hamster ovarian follicle cells. *Endocrinology* 96:694-701.

- Marrone, B. L., y Hertelendy, F. (1983). Steroid metabolism by avian ovarian cells during follicular maturation. *Biol Reprod* 29:953-962.
- Marrone, B. L., y Hertelendy, F. (1983). Steroidogenesis by avian ovarian cells: Effects of luteinizing hormone and substrate availability. *Am J Physiol* 244 (Endocrinol Metab 7): E487-E493.
- Marrone, B.L., y 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.
- Marrone, B.L., Wiebe, J.P., Kevin D. Buckingham., y Frank Hertelendy. (1985). Analysis of steroid metabolites produced by theca cells from the adult domestic hen. *J Steroid Biochem* 23 (3):375-378.
- Maung, I. W., y Follett, B. K. (1977). Effects of chicken and ovine luteinizing hormone on androgen release and cyclic AMP production by isolated cells from the quail testes. *Gen Comp Endocr* 33:242-253.
- Merchant-Larios, H. (1978). Ovarian differentiation In: *The vertebrate ovary*, (editado por Richard E. Jones), Plenum Press. New York and London. p.p. 47-77.
- Nakamura, T., Tanabe, Y., y Hirano, H. (1979). Progesterone and estradiol levels in follicles and the in vitro metabolism of steroid hormones by hens during the ovulatory cycle. *Japanese Journal of Poultry Science* 16:15-25.
- Narbaitz, R., y Kolodny, L. (1964). 5. 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase in differentiating chick gonads. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 63:612.
- Narbaitz, R., y Adler, R. (1966). Submicroscopical observations on the differentiation of chick gonads. *J Embriol Exp Morphol* 16:41-47.
- Narbaitz, R. (1971). Ultrastructural aspects of cortical differentiation in chick ovaries and intersexual gonads. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 118:315-323.
- Nonidez, J.P. (1922). Estudios sobre las gonadas de la gallina. II. El tejido intersticial del ovario. Libro en honor de S. Razon y Cajal, Madrid. 2:137-157.
- Peel, E.T., y Bellairs, R. (1972): Structure and development of the secretory cells of the hen's ovary. *Z Anat Entwicklgesch* 137:170-182.
- Pedernera, E., Gómez, Y., Velázquez, P., Juárez-Oropeza, M.A., y Bonzález del Pliego M. (1988). Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken.

- Porter, T.E., y El-Malawani, M.E. (1987). Differential steroidogenesis between theca interna and theca externa layers of preovulatory follicles in the domestic turkey. Abstract Biol Reprod (Supp 1) 36:92.
- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 17:208-212.
- Rickwood, D., A. Hell, y G.D. Birnie. (1973). Isopycnic centrifugation in acrylamide gradients. FEBS Lett 33:221.
- Robinson, F.E., y Etches, R.J. (1986): Ovarian steroidogenesis during follicular maturation in the domestic fowl (Gallus domesticus). Biol Reprod 35:1096-1103.
- Roanoff, A.J. (1960). The avian embryo. Structural and functional development. New York. Mc millan Co.
- Ryan, K.J., y Short, R.V. (1985). Formation of estradiol by granulosa and thecal cells of the equine ovarian follicle. Endocrinology 76:108-114.
- Ryan, K.J., Petro, Z., y Kaiser, J. (1968). Steroid formation by isolated and recombined ovarian granulosa and theca cells. J Clin Endocrinol Metab 28:355-358.
- Scanes, C. G., y Fagioli, J.H. (1980). Effects of mammalian and avian gonadotropins on in vitro progesterone production by avian ovarian granulosa cells. Gen Comp Endocr 41:1-7.
- Scheib, D., y Haffen, K. (1967): Etude histochimique de la 3 β -hydroxysteroido deshydrogenase des jeunes gonades embryonnaires de poulet. C R Acad Sci (Paris) 264:161-164.
- Scheib, D. y Haffen, K. (1969). Aparition et localisation des hydroxysteroides deshydrogenases (3 β et 17 β) dans les gonades de la caille (Coturnix coturnix japonica) et du poulet (Gallus domesticus): Etude histoenzimologique comparative. Gen Comp Endocr 12:586-597.
- Scheib, D. (1970). Sur la presence de cellules interstitielles primaires dans les cordons du testicule de l' embryon de poulet. C R Acad Sci Ser D Sci Nat 270:123-125.
- Senior, B.E., y Cunningham, F.J. (1974): Oestradiol and luteinizing hormone during the ovulatory cycle of the hen. J Endocr 60:201-202.
- Senior, B.E. y Furr, B.J. (1975). A preliminary assessment of the source of oestrogen within the ovary of the domestic fowl (Gallus

domesticus). J Reprod Fert 43: 241-249.

Shahabi, N.A., Norton, H.W. y Naivandov, A.V. (1975). Steroid levels in follicles and in the plasma of hens during the ovulatory cycle. Endocrinology 96:972-979.

Siiteri, P.K., y Thompson, E.A. (1975). Studies of human placental aromatase. J Steroid Biochem 6:317-332.

Stahl, A., y N. Carlson. (1973). Morphogenèse des cordons sexuels et signification de la zone médullaire de la gonade chez l'embryon de poulet. Acta Anat Basel 85:248-274.

Show-Ching Wang., y Bahr, J.M. (1983). Estradiol secretion by theca cells of the domestic hen during the ovulatory cycle. Biol Reprod 28:618-624.

Tanabe, Y., Takashi Yano., y Takao Nakamura. (1983). Steroid hormone synthesis and secretion by testes, ovary and adrenals of embryonic and postembryonic ducks. Gen Comp Endocr 49:144-153.

Tennant, J.R. (1964). Evaluation of the trypan blue technique for the determination of cell viability. Transplantation 2:685.

Teng, C.T., y Teng, C.S. (1977). The hormonal regulation of steroidogenesis and adenosine 3' 5' cyclic monophosphate in embryonic chick ovary. Biochem J 162:123-134.

Teng, C.T., y Teng, C.S. (1977). Studies on sex-organ development, the hormone regulation of steroidogenesis and adenosine 3' 5' cyclic monophosphate in embryonic chick ovary, Biochem J 162:123.

Teng, C. T. y Teng, C.S. (1979). Studies on sex organ development. Separation and culture of steroid producing cells from growing and regressing embryonic ovaries. Endocrinology 104 (5):1337-1345.

Teng, C. T., Teng, C.S., Boustiel, G.P., Wang King Liu., y Ward, D.N. (1982). Differentiation response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. Gen Comp Endocr 48:325-332.

Tojo, H., Fujii, M., y Ogawa, H. (1982). Proteolytic enzymes and gonadal hormones of the ovarian follicle wall during ovulation in the domestic fowl (gallus domesticus). J Reprod Fert 64:73-77.

Wells, J.W., Gilbert, M.B., y Culbert, J. (1980). Effect of luteinizing hormone on progesterone secretion in vitro by the granulosa cells of the domestic fowl (Gallus domesticus). J Endocr 84:249-254.

Wells, J.W., Dick, H.R., y Gilbert, A.B. (1981). The biosynthesis of progesterone by fowl granulosa cells in vitro from ¹⁴C-labelled substrates. J Steroid Biochem 14:651-656.

Wells, J. W., Marion A. Walker, J., y Gilbert, A.B. (1985).

Comparison of the response in vivo to luteinizing hormone and follicle stimulating hormone of the granulosa of six follicles from the ovarian hierarchy in the chicken (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol* 59:369-374.

Weniger, J.F. (1971). Biosynthese d' oestrogenes par les ebauches gonadiques de poulet. *Gen Comp Endocr* 16:391-397.

Willier, B. H. (1939). Embryonic development of sex. In *Sex and internal Secretions*, 2nd ed. (E. Allen, ed.), p.p. 64-144. Bailliere, Tindal and Cox, London.

Wilson, S.C., y Sharp, P.J. (1973): Variation in plasma LH levels during the ovulatory cycle of the hen, (*Gallus domesticus*). *J Reprod Fertil* 35:561-564.

Witschi, E. (1956). Development of vertebrates. Ed. Saunders, Philadelphia.

Wolff, E. T. (1968). Le probleme de la differenciation sexuelle et les questionnes generales d' embryologie. Suppl. dans L' origine de la lignee germinale chez les vertebres et chez quelques groupes d' invertebres. Leningrad. Medicina. p.p. 327-336.

Woods, J.E., y Podczaski, E.S. (1974). Androgen synthesis in the gonads of the chick embryo. *Gen Comp Endocr* 24:413-423.

Woods, J. E., y Erton, L.H. (1978). The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. *Gen Comp Endocr* 36:360-370.

Woods, J.E. y Brazzil, D.M. (1981). Plasma 17 β -estradiol levels in the chick embryo. *Gen Comp Endocr* 44:37-43.