

FACULTAD DE CIENCIAS (BIOLOGIA)  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



**ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LAS  
POBLACIONES ESTEROIDOGENICAS DURANTE  
EL DESARROLLO DEL OVARIO DE LAS AVES**

**TESIS LLEVADA A CABO EN EL DEPARTAMENTO DE  
EMBRIOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Bajo la Dirección del Dr. Enrique Pedernera Astegiano**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

**ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LAS POBLACIONES CELULARES  
ESTEROIDOGENICAS DURANTE EL DESARROLLO DEL OVARIO EN LAS AVES.**

<b>INDICE Y RESUMEN</b>	(1-4)
<b>INTRODUCCION</b>	(5-37)
<b>1. EL EJE HIPOTALAMO-HIPOPISIS-GONADA.</b>	
<b>2. LA ONTOGENIA DE LAS CELULAS ESTEROIDOGENICAS EN EL OVARIO DE MAMIFEROS.</b>	
<b>3. LA ONTOGENIA DE LAS CELULAS ESTEROIDOGENICAS EN EL OVARIO DE LAS AVES.</b>	
<b>4. LA FUNCION ESTEROIDOGENICA EN EL FOLICULO OVARICO DE MAMIFEROS.</b>	
<b>5. LA ESTEROIDOGENESIS EN EL FOLICULO OVARICO DE LAS AVES.</b>	
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	(38-39)
<b>HIPOTESIS</b>	(40-41)
<b>OBJETIVOS</b>	(42)
<b>MATERIAL Y METODOS DE ESTUDIO.</b>	(43-48)
<b>RESULTADOS.</b>	(49-71)
<b>DISCUSION.</b>	(72-78)
<b>CONCLUSIONES.</b>	(79-80)
<b>BIBLIOGRAFIA.</b>	(81-92)
<b>ANEXO</b>	(93-114)

## **RESUMEN.**

Durante el desarrollo temprano de la gónada femenina en las aves, se ha visto que además de las células germinales y el epitelio superficial, existen cordones de células epiteliales en la región medular del ovario. A partir de estos cordones medulares se forman las células esteroideogénicas también llamadas intersticiales y los canales o vasos lacunares, característicos de las aves. Los cordones alcanzan gran desarrollo al nacimiento y ocupan un 18 % de la médula ovárica. El objetivo de este trabajo es analizar la evolución de estos cordones medulares a través del desarrollo del ovario en las aves, conocer su participación en la formación de folículos y su probable destino en los folículos preovulatorios del ovario adulto. A tal efecto se criaron pollos de la raza Leghorn blanca, se obtuvieron los ovarios izquierdos de las hembras a diferentes edades: 0, 7, 15, 21, 28 y 36 días posnatales, además de gallinas jóvenes en franca postura.

Se realizaron estudios de microscopía de luz y de microscopía electrónica de transmisión en los ovarios de las distintas edades.

En los ovarios de pollo recién nacidos, a los que se les aplicó un tratamiento perinatal con gonadotropina coriónica humana (hCG), se evaluaron los cambios morfológicos producidos en la médula ovárica, en particular en los cordones de células poco diferenciadas, los cordones de células intersticiales y las células que forman el sistema de canales lacunares del ovario.

En el ovario de las gallinas jóvenes ponedoras, se analizaron los cambios morfológicos que ocurren a través del desarrollo folicular. Se identificaron los componentes esteroideogénicos en los folículos blancos pequeños y en los folículos amarillos

preovulatorios, que son designados desde el F6 al F1 en base a su diámetro.

Algunos de los resultados más importantes se comentan:

1. Se visualizan abundantes cordones epiteliales de células poco diferenciadas en la médula subcortical del pollo al nacimiento y se identifican islotes de células esteroideogénicas, que son más abundantes en la médula profunda.

2. En el ovario de pollitas de 7 días de edad, los folículos primarios invaden la médula ovárica y los cordones de células poco diferenciadas se localizan próximos a los folículos. Los grupos de células esteroideogénicas se observan entre los folículos.

3. En edades más avanzadas, de 15 y 21 días, los cordones de células poco diferenciadas se localizan en rodeando a los folículos en crecimiento.

4. En ovarios de pollitas de 28 y 36 días de edad, los cordones de células poco diferenciadas que se encuentran ubicados alrededor de los folículos, muestran imágenes que sugieren su transformación a células esteroideogénicas típicas.

5. En la gallina ponedora, los folículos blancos pequeños tienen una morfología similar a la descrita para los folículos de la edad de 36 días. En los folículos F6 y F5, que son los más pequeños de los preovulatorios, presentan en la teca interna en contacto directo con la capa folicular, abundantes cordones de células esteroideogénicas formando un cinturón que rodea al folículo y los cordones epiteliales poco diferenciados se localizan en la teca externa.

En el estadio de F4 y F3 adquieren su máxima diferenciación estos componentes esteroidogénicos, aunque en el folículo F3 los cordones de células poco diferenciadas comienzan a disminuir considerablemente. En los folículos F2 y F1 existe cierta degeneración en las células esteroidogénicas de la teca interna y los cordones células de poco diferenciadas están ausentes en la capa teal externa.

6. Los resultados obtenidos después del tratamiento con hCG, en el pollo recién nacido demuestran que hubo un aumento en el volumen de los cordones de células intersticiales y hubo un mayor desarrollo del sistema lacunar y de los capilares sanguíneos, así como una reducción en el número de células germinales en el estroma de la médula ovárica.

7. La ultraestructura de la médula ovárica, de las aves estimuladas con hCG, demostró que las células poco diferenciadas aumentaron su área mitocondrial y del RER, se encontraron imágenes transicionales entre las células poco diferenciadas y las esteroidogénicas.

En las células esteroidogénicas se detectó un aumento de citoplasma, así como en el área ocupada por mitocondrias. Las células epiteliales de los canales lacunares también refleja un incremento en las mitocondrias y en el RER.

# **ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LAS POBLACIONES CELULARES ESTEREOGENICAS DURANTE EL DESARROLLO DEL OVARIO EN LAS AVES.**

## **INTRODUCCION.**

El ovario es un órgano que ha despertado gran interés en la endocrinología. Uno de los problemas más estudiados en las últimas décadas, ha sido la actividad biosintética de los esteroides, su regulación a través del sistema nervioso central y periférico; así como los cambios que ocurren durante el desarrollo gonadal hasta que alcanza su maduración y con ello la instalación de un ciclo ovárico. Las hormonas esteroides, juegan un papel importante en la diferenciación sexual, en la actividad reproductora y en la conducta de los vertebrados. Una de las características de las hembras, es la presencia de variaciones cíclicas, de tal forma que en los mamíferos se ha podido caracterizar un ciclo estral en unas especies y menstrual en otras, en ambos la secreción de hormonas esteroideas sufren cambios regulados por secreción de las gonadotropinas hipofisarias: la hormona foliculo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Sharp y Fraser, 1978 y Reeves, 1988).

### **1. EL EJE-HIPOTALAMO-HIPOFISIS-GONADA.**

La iniciación del fenómeno de reproducción se ve influenciado por estímulos medioambientales y neuroendócrinos, que son integrados por el sistema nervioso. Estos efectos fueron estudiados entre otros por Houssay et al, (1935); Rasmussen, (1938) y Harris, (1937), (1955) y (1961), quienes determinaron que uno de los órganos que estaba interactuando en esta regulación era el hipotálamo y que a través de una vía vascular se establecía un

transporte de información hacia la hipófisis. Estos investigadores, hicieron experimentos con el fin de evidenciar, que relaciones existían en el tracto nervioso, comprometidas con la función reproductora.

En los primeros estudios se eliminó la hipófisis, evitando así la integración del eje hipotálamo-hipófisis y se obtuvo como resultado una atrofia gonadal. De igual manera, la destrucción del hipotálamo también produjo importantes modificaciones en la hipófisis, junto con el retraso en la diferenciación de las gónadas. Así también, se determinó que la estimulación del hipotálamo en ratas, durante la etapa del estro, desencadenaba la ovulación.

En ese tiempo se iniciaron estudios para evaluar la interdependencia entre hipotálamo e hipófisis, evidenciándose la participación de neurosecreciones del hipotálamo que se difundían a través del sistema vascular porta (Scharrer y Scharrer, 1954).

Por otro lado, se estableció que los componentes de la hipófisis tenían un origen embriológico dual. La neurohipófisis o lóbulo neural, que se origina de una evaginación de tejido nervioso de la vesícula diencefálica en la región del infundíbulo y la adenohipófisis que se forma a partir de una evaginación ectodérmica del estomodeo (Bolsa de Rathke), por delante de la membrana bucofaringea. La adenohipófisis es el sitio donde se producen la FSH, la LH y la prolactina (PRO), aparentemente un mismo tipo de células basófilas y PAS positivas son productoras de la FSH y LH según las evidencias aportadas por Nakane (1970). En un intento por identificar la presencia de estas poblaciones celulares, se emplearon colorantes ácidos (Mallory, 1900), que ponían en evidencia un poder tintoreo específico. Más tarde se desarrollaron modificaciones a estas técnicas, que en el caso de algunas especies, permitió la diferenciación de células cuyo contenido era básicamente protéico, de otras que presentaban

gránulos glucoprotéicos.

No obstante que algunos problemas no han sido resueltos, han aparecido trabajos en los cuales proponen que las gonadotropinas se producen en diferentes poblaciones celulares hipofisiarias (Sturkie, 1976 y Everet, 1987). Con los avances en la purificación de hormonas adenohipofisiarias y con el manejo de los anticuerpos, surgieron métodos inmunohistoquímicos, a nivel de microscopía de luz y electrónica (Conns, 1956), que apoyaron el reconocimiento de estas poblaciones; de tal forma que las células que secretan la (PRO) han sido evidenciadas inmunocitoquímicamente, a la vez que pueden ser reconocidas empleando colorantes ácidos. Pero en algunos otros casos, estas técnicas no permiten diferenciar los tipos celulares adecuadamente, como ocurre en las células gonadotropas cuyos gránulos reaccionan con ambos anticuerpos, para FSH y LH (Halmi y Krieger, 1983). También se utilizó el ácido peryódico (Mc Manus, 1946), para diferenciar histoquímicamente las células serosas de las tipo mucoides, se identificaron como de este último tipo a las células productoras de FSH, LH, Hormona estimulante de los melanocitos (MSH) y la Hormona estimulante de tiroides (TSH), las cuales se ha demostrado que son glucoproteínas. Las hormonas gonadotrópicas de la hipófisis anterior, regulan la producción hormonal de la gónada femenina en los mamíferos. Se ha demostrado que la FSH ejerce su estímulo sobre el crecimiento y maduración de las células granulosas que conforman el epitelio de los folículos ováricos en desarrollo. Además de que induce la producción de estrógenos en el folículo, esto trae como consecuencia la liberación de LH por la hipófisis. La LH estimula al folículo maduro desencadenando el fenómeno de ovulación (Wells y Gilbert, 1984).

Es sabido, que las gonadotropinas son controladas por una neurosecreción de origen hipotalámico, a la cual se le ha llamado

factor o factores liberadores de las gonadotropinas. Inicialmente hacia los años '60s. se identificó en extractos obtenidos de hipotálamo una sustancia denominada "factor liberador de hormona luteinizante" (LHRF). La actividad de este factor se probó en un principio, empleando como modelo a la coneja y a la rata en la etapa de estro, durante un proestro inducido experimentalmente con pentobarbital. En ambos casos el LHRF produjo la inducción de la ovulación, (Harris, 1961). Otro de los experimentos clásicos fué el realizado por Mc. Cann et al, (1960), estos autores empleando la técnica de depleción del ácido ascórbico en el ovario (OAAD), de la rata, midieron los niveles de la LH . Empleando extractos obtenidos de regiones del tallo hipotalámico, de la eminencia media, vieron que causaban la liberación de la LH en ratas inmaduras pretratadas con gonadotropinas.

Posteriormente, Ramírez y Mc Cann, (1963), determinaron el LHRF, usando modelos "in vitro". Obtuvieron extractos de regiones hipotalámicas de rata, los cuales al ser adicionados al medio de cultivo de hipófisis tomadas de ratas ovariectomizadas y previamente sensibilizadas con estrógenos y progesterona, estimularon la liberación de LH .

Igarashi y Mc Cann, (1964), obtuvieron un factor liberador de la hormona foliculo estimulante (FSHRF); que al probarlo en las ratas ovariectomizadas y sometidas a un estímulo previo de estrógeno y progesterona, producía un incremento de las concentraciones de FSH en el plasma; esta elevación de FSH se identificó al probarlo en el ratón, dando como resultado un aumento en el peso del oviducto.

El desarrollo de nuevas técnicas como es la del radioinmunoensayo de las gonadotropinas hipofisarias, influyó en un mejor conocimiento de los factores liberadores de gonadotropinas producidas por el hipotálamo. Con el fin de evaluar la actividad de estos extractos hipotalámicos denominados FSHRF y

LHRF en la liberación de gonadotropinas FSH y LH respectivamente, se emplearon técnicas "in vivo" e "in vitro" (Schally et al, 1971a). El FSHRF se determinó en extractos de hipotálamo obtenido de porcinos (Schally et al, 1969) y se pensó en la existencia de dos factores liberadores, el LHRF y el FSHRF en hipotálamo de ovinos, pero a pesar de los esfuerzos que varios investigadores realizaron, no fue posible detectar por separado la actividad específica de cada uno. Se llegó a la conclusión de que ambas sustancias correspondían a un solo factor que denominaron hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) y que tenía efecto tanto en la liberación de la FSH como de la LH (Schally et al, 1971 b).

Se tienen otros reportes sobre la posible existencia de dos factores liberadores diferentes, se propone que uno actúa sobre la FSH y el otro sobre la liberación de LH, (Mc Cann y Porter, 1969, Igarashi et al, 1974 y Everet, 1987), pero los datos obtenidos hasta ahora no son concluyentes. Se ha visto que aún las preparaciones más enriquecidas de FSHRH tienen una pequeña contaminación con la LHRH y por lo tanto estimula a las dos gonadotropinas.

Estudios inmunológicos han demostrado una vez más la actividad de un solo factor liberador LHRH, utilizando el método de inmunización de ratas en contra de un LHRH sintético, su administración provocó la disminución de la concentración de ambas gonadotropinas en hipófisis y en el torrente sanguíneo de manera muy similar, con lo cual se demuestra que la LHRH sí controla la actividad de FSH y LH, y que además la ausencia de LHRH produce atresia gonadal (Fraser et al, 1974 y 1975).

Actualmente a este factor liberador de gonadotropinas se le conoce también como hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). El grupo de Matsuo et al (1971), aisló, purificó y estableció la secuencia de aminoácidos de los factores liberadores de FSH y LH

obtenidos de porcino, caracterizando así la GnRH lo que les valió obtener el premio Nobel.

Años más tarde, se descubrió que existen dos formas diferentes de liberación de la FSH y la LH. La secreción basal, donde la FSH en presencia de la LH, actúa estimulando la ovogénesis, y la secreción pulsátil de la LH, que sigue un patrón cíclico específico y que produce la ovulación. La liberación de estas gonadotropinas, tanto basal como cíclica, está regulada a su vez por un sistema de retroalimentación de tipo negativo o positivo, por las hormonas esteroides gonadales. El sitio de acción de los esteroides en este sistema es a nivel de la **parte distal** de la hipófisis y del hipotálamo. La señal de los esteroides ováricos depende de: a) la concentración de los mismos, b) el tipo de esteroide producido, c) el tipo de proteína transportadora para estas hormonas esteroides y d) la cantidad de receptores localizados en las células efectoras de la hipófisis y del hipotálamo. Todo esto, actuando de manera coordinada, completa lo que se ha denominado eje hipotálamo-hipófisis-gonadal.

Un ejemplo de la integración del eje es la secuencia de eventos que provoca la ovulación en la hembra. El eje hipotálamo-hipofisiario es estimulado por un mecanismo de retroalimentación positivo por el  $17\beta$ -estradiol ovárico, el cual es producido por él o los folículos preovulatorios, lo que produce una descarga de GnRH y luego la liberación de LH que finalmente provoca la ruptura del folículo de Von Graaf. El factor GnRH promueve la secreción de la FSH y la LH, y aunque hasta ahora no ha sido posible identificar aún un factor específico liberador de la FSH, recientemente se ha propuesto que la regulación diferencial para estas dos secreciones de gonadotropinas adenohipofisarias, puede estar bajo el efecto de un neurohumor, que actúa como un factor liberador específico de la FSH, producido en el hipotálamo (Everet, 1988), a pesar de ello, este aspecto sigue siendo una

incógnita.

Existen antecedentes de que los niveles LH/FSH están influenciados por los cambios que se presentan en la secreción pulsátil de GnRH (Wise et al, 1979 y Wildt et al, 1981), por lo que la liberación de LH parece estar regulada por las frecuencias altas, mientras que la de la FSH está favorecida por las bajas frecuencias.

Recientemente, ha despertado gran interés la influencia de los esteroides sobre la neuroquímica hipotalámica, y sobre la participación de algunos neurotransmisores y enzimas hipotalámicas, que de alguna manera intervienen en la síntesis, transporte y liberación de la GnRH.

## **2. LA ONTOGENIA DE LAS CELULAS ESTEROIDOGENICAS EN EL OVARIO DE MAMIFEROS.**

Tempranamente, en el ovario fetal de los mamíferos, se produce un desarrollo notable en la región cortical, acompañada por una proliferación de las ovogonias, que más tarde se diferencian en ovocitos primarios, en el momento que se inicia la Profase I de la Meiosis; a continuación los ovocitos detienen su Meiosis I en la etapa de Dictioteno, donde permanecen hasta que se desencadena su maduración.

La diferenciación de los folículos ováricos en los mamíferos, al igual que otros vertebrados, se encuentra sujeto a cambios provocados por la acción de hormonas desde etapas muy incipientes del desarrollo hasta el momento de alcanzar su maduración. En la mayoría de los mamíferos se ha reconocido un ciclo estral bien definido, que coincide con los patrones de crecimiento y diferenciación folicular. Su morfología ha sido evaluada por numerosos autores (Brambell, 1956, Harrison, 1962, Guraya, 1971). La integración de los folículos se realiza paulatinamente, a

medida que avanza el desarrollo de la gónada femenina, en ella participan diferentes componentes celulares, los ovocitos sufren una transformación (Zamboni y Merchant 1973, Merchant, 1978 y Wartenberg, 1983), de estar constituyendo acúmulos o nidos se aíslan e individualizan; a continuación establecen contacto con las células granulosas, que al principio es una sola capa y por divisiones sucesivas se forman varias capas, las cuales se rodean de una membrana basal que las compartamentaliza y posteriormente, a partir del mesénquima subyacente, se origina la capa tecal bien definida, que a su vez se diferencia en interna y externa, para constituir así, el folículo que prosigue su diferenciación hasta alcanzar su maduración estructural y fisiológica. Estos folículos ya constituidos van a funcionar como una unidad independiente, en cuanto a la producción de estradiol (Byskov, 1975 y Byskov et al, 1977).

En general, dentro de los mamíferos, la formación de los folículos se lleva a cabo durante la vida embrionaria como es el caso del humano, mono, oveja, vaca, caballo, etc, aunque en algunos grupos este puede iniciarse en la etapa perinatal, ya sea en el estadio de inmadurez o hacia el nacimiento, como sucede en el ratón (Bookhout, 1945, Ioannou, 1964, van Wageningen y Simpson, 1965, Deaneely, 1975 a,b y Peters et al, 1975). No todas las células germinales se organizan en folículos al mismo tiempo, pueden encontrarse formando nidos de ovocitos, organizadas a manera de sinsicio en la región mas periférica de la corteza o encontrarse aisladas.

En la mayoría de los mamíferos, se refiere que existe en etapas tempranas del desarrollo, una gran degeneración de células germinales y que al nacimiento se reduce considerablemente el número de ovocitos. En el humano, este fenómeno se presenta al 5o mes de desarrollo intrauterino; de tal modo que al nacer solo quedan aproximadamente un millón, de los 5 millones de células

germinales que existían en un principio (Baker, 1963).

Se ha reportado que en los mamíferos jóvenes, los folículos en crecimiento se localizan sobre todo en la zona más interna de la corteza y los que no están en fase de crecimiento se ubican en la porción externa de corteza (Peters, 1969, Mossman y Duke, 1973, Peters et al, 1975). Se sabe que para que los folículos se desarrollen adecuadamente se requiere de la presencia de las células germinales, estas van siendo rodeadas por las células pregranulosas, originadas a partir del epitelio superficial, el cual se organiza para formar de esta manera los folículos primordiales, que son los más incipientes y están constituidos por un ovocito rodeado por epitelio plano simple. El mayor porcentaje de folículos observable a cualquier edad, es de folículos primordiales, ya que a partir de ellos se inicia el desarrollo folicular.

En la foliculogénesis participan además de las germinales, otros componentes importantes como son : el epitelio celómico, parte del mesenquima subyacente que se origina de la cresta mesonéfrica y túbulos mesonéfricos que se insinúan dentro de la gónada y originan la rete ovarii (Gillman, 1948, Patten, 1953, Hamilton y Mossman, 1972, Byskov y Lintern-Moore, 1973 y Peters, 1976). El inicio de la formación de estos primeros folículos, se ha visto que estimula la proliferación celular del propio epitelio folicular, este periodo proliferativo del epitelio se ha descrito en humanos (Gondos, 1975), en perro (Andersen y Simpson, 1973) y en cueros (Jeppesen, 1975); los cordones así originados por esta capa, penetran en el interior del ovario y se van diferenciando en células granulosas. como lo afirman los estudios de Brambell, (1927), Everett, (1943), Gillman, (1948), Watzka, (1961) y Franchi et al, (1962).

Existe cierta polémica sobre el origen de las células granulosas ; algunos autores han propuesto que los componentes

celulares de la rete ovarii, originan también a las células granulosas, tomando en cuenta las siguientes evidencias experimentales: a) que la organización folicular se desarrolla en la porción mas interna de la corteza, contigua a la región medular; b) que ésta región medular ovárica va a estar formada principalmente por cordones medulares, túbulos de la rete ovarii y mesenquima; c) que estos cordones originados en la médula ovárica, señalados como estroma o blastema central por von Koliker (1898) y otros autores, es evidente que corresponden a la misma rete ovarii; Y d) que en mamíferos como: humano, conejo, perro, cerdo, caballo, topo y ardilla gris, se ha descrito que presenta una estrecha relación entre los cordones de la rete ovarii y las células germinales.

Por lo anterior algunos autores como Byskov (1975 y 1978), proponen que las células granulosas se diferencian a partir de las células cordonaes de la rete ovarii e indican que se requiere indiscutiblemente, su presencia en la organización temprana de los folículos ováricos (Byskov, 1974 y Byskov et al, 1977).

Sin embargo la mayoría de los autores considera que, el epitelio superficial contribuye en la formación de estos cordones medulares de la rete ovarii y que a partir de su diferenciación se originan las células granulosas. Este proceso difiere de acuerdo con la especie de que se trate, de tal forma que el componente epitelial, se ha reportado como esencial en algunas especies como en el humano, el perro y otros mamíferos, mientras que en otras especies se le ha restado importancia, como sucede en el ratón. Se ha hablado también, de que este epitelio puede estar jugando un papel en la remoción de células ováricas en degeneración (Byskov, 1978).

En el ovario fetal humano se han identificado células intersticiales primarias, con características de células productoras de esteroides, pero se ha visto que aún no poseen un

sistema enzimático bien integrado, para llevar a cabo la biosíntesis esteroidea (Erikson et al, 1955). No está claro aún que poblaciones celulares del ovario intervienen en la regulación esteroidogénica, por lo cual se requiere de un estudio futuro más detallado.

Por otro lado, el papel de las gonadotropinas en la regulación de la esteroidogénesis del ovario en la etapa fetal, no ha sido totalmente esclarecido, a pesar de ello se han publicado trabajos donde se demuestra la secreción del 17 $\beta$ -estradiol en el ovario fetal de mamíferos; esta secreción es independiente de la regulación hipofisiaria durante las etapas tempranas de su organogénesis, además de que no se han podido identificar claramente las poblaciones celulares que participan en este mecanismo (Gondos et al, 1983).

Las células foliculares se rodean de una membrana basal bien definida que las compartamentaliza y al avanzar el desarrollo folicular, la capa granulosa presenta un arreglo pseudoestratificado característico de un folículo en crecimiento (Lipher y Cross, 1968).

Posteriormente, la capa granulosa del folículo en desarrollo se encuentra constituida por varias capas celulares que mantienen un gradiente funcional; al transcurrir su diferenciación originan un espacio o antro en el interior de la masa celular, adoptando la morfología de folículos antrales, hasta alcanzar la etapa de folículo maduro o de Von Graaf. En este último, se forma una capa de células que rodean al ovocito y otro estrato celular que queda en contacto directo con la capa tezal. Las células que quedan rodeando al ovocito establecen una relación muy estrecha, por medio uniones de tipo comunicante que cruzan la zona pelúcida y a través de ellas hay difusión de ciertas sustancias y de iones, estas granulosa contiguas al ovocito, se diferencian funcionalmente de las demás. Las células granulosa murales poseen

gran cantidad de receptores a LH (Zelevnik, et al, 1974; Amsterdam, et al, 1975); se encuentran más relacionadas con la capa tecal interna, además de que presentan una gran actividad enzimática de la 5-4 isomerasa 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD) y el nivel requerido del citocromo P-450 del SCC (Midgley, 1972).

A pesar de que las granulosa no presentan ninguna vascularización propia, se ha detectado la transferencia de información desde las células granulosa murales hacia las células mas internas del folículo, alcanzando a las granulosa que rodean al ovocito y se ha visto que a través de las uniones comunicantes, ya referidas, es que se transfiere la información al propio ovocito; prueba de ello es la transmisión de las respuestas mediadas por el Adenosin monofosfato cíclico (cAMP) como es la respuesta a la gonadotropina LH, que es muy importante en el fenómeno de la ovulación. Además, se ha demostrado que durante la respuesta al pico de LH preovulatorio, la proliferación celular de la capa granulosa se detiene iniciándose la luteinización de esas células (Rao, et al, 1978).

El mesénquima gonadal localizado en la médula ovárica, origina el tejido conectivo del estroma ovárico, vasos sanguíneos y el tejido intersticial esteroideogénico.

Se han identificado algunos de los componentes del tejido esteroideogénico (Brambel, 1956), como son las células intersticiales de la teca, localizadas externamente a la capa granulosa, de los folículos ováricos en diferentes estadios de maduración, así como en folículos atresicos; este investigador junto con otros (Guraya y Greenwald, 1964), observaron que cuando los folículos caen en atresia, en cualquiera de sus etapas de diferenciación, las células granulosa empiezan a desaparecer y a continuación las células de la teca se hipertrofian. En la rata se ha reportado, que el tejido intersticial del ovario se localiza en

forma de acúmulos de diferentes tamaños, provenientes de la hipertrofia de la capa tecal de folículos tanto preantrales como antrales (Guraya y Greenwald, 1964); además de estos componentes se ha puesto en evidencia la presencia de la glándula intersticial del ovario.

En los mamíferos podemos localizar básicamente dos tipos celulares con función esteroideogénica: 1) Células secretoras que responden a la FSH, como son las células granulosas, las cuales conforme avanza la maduración folicular, pueden llegar a desarrollar una respuesta ante la LH. 2) Las células que son estimuladas por la LH, cuyos representantes son las células intersticiales del estroma ovárico y las células que forman la teca interna del folículo ovárico. Ambas poblaciones difieren en el tipo de respuesta, la liberación de hormonas esteroideas ováricas y en su actividad enzimática.

Por lo que desde hace algunos años se demostró, que las células granulosas y tecales del folículo ovárico están comprometidas con la función esteroideogénica, de tal forma que ambas producen esteroides (Blanchette, 1966) e incluso también se han podido detectar metabolitos esteroideos en el interior del licor folicular.

La capa tecal se localiza en la periferia de los folículos en desarrollo, no así en los folículos primarios donde está ausente. En un folículo maduro, la teca se encuentra constituida por 2 zonas: La teca interna, que es vascular, en donde se localiza tejido con actividad esteroideogénica y la teca externa, fibrosa y avascular.

En el ovario inmaduro del ratón, se ha propuesto que la capa tecal se forma a partir de células de la rete intraovárica (Hoyer y Biskov, 1981). Tratando de aclarar este problema, se observó que estas células aparentemente dan lugar, al tejido intersticial primario. Es importante diferenciar la localización de estas dos

zonas, ya que no parecen tener iguales actividades biosintéticas. Las células intersticiales reciben inervación simpática directa y a diferencia de la teca no son receptivas a la regulación parácrina de las secreciones de la capa granulosa.

Las células intersticiales del ovario o células intersticiales primarias, también llamadas glándula intersticial del ovario, se localizan entre los folículos, en el ovario de ratas inmaduras (Dowson y Mc. Cabe, 1951). Su origen es aún incierto y existe gran controversia al respecto. Se ha propuesto que puede originarse de protrusiones de células granulosas de folículos en desarrollo, además de que pueden estar formadas a partir de proliferaciones del epitelio superficial, en etapas tempranas de la organogénesis del ovario (Rennels, 1951). Por otro lado, se ha demostrado que las células intersticiales se originan, en otros mamíferos, del estroma ovárico y desempeñan un papel importante en la producción de esteroides en el ovario (Deanesly, 1970). Intervienen en la actividad biosintética de los andrógenos, a través de la vida reproductora de los mamíferos y su participación perdura aún en los ovarios viejos.

Se ha reportado que las células intersticiales glandulares, en ciertos mamíferos, se llegan a constituir mediante una transformación parecida a la luteínica, a partir de elementos del tejido conectivo, específicamente de fibroblastos de la teca interna de folículos atrésicos, de folículos recientemente ovulados, así como del estroma ovárico.

Otro de los componentes ováricos importantes que se ha descrito, es el representado por el tejido glandular intersticial secundario, que sustituye al tejido intersticial primario; así también se deriva de células tecales hipertrofiadas que quedan como restos de la atresia de folículos en diferentes estadios de desarrollo.

Las células hiliares del ovario, células glandulares

intersticiales hiliares o también llamado "cuerpo rete hiliar", en los mamíferos, se originan a partir de los cordones epiteliales que conforman la rete ovarii y presentan una morfología característica de células esteroidogénicas. En el ovario inmaduro del ratón, se identificó la formación de células hiliares a partir de la rete del ovario, conectados a este sistema se localizaron ovocitos en desarrollo; además se logró poner en evidencia la actividad de la 3 $\beta$ -HSD en estas poblaciones hiliares.

El cuerpo lúteo también adquiere importancia en la esteroidogénesis de los mamíferos, es el resultado de una serie de cambios morfológicos y bioquímicos a nivel de las células granulosa y de la teca de los folículos preovulatorios. Estos cambios preovulatorios se producen debido a un aumento importante de la LH en el plasma y provocan una hipertrofia de las células foliculares. En el momento de ocurrir la ovulación, se presenta una ruptura de la membrana basal que rodea a la capa granulosa, produciendo una salida de sangre de los vasos de la teca interna, constituyendo así el cuerpo hemorrágico.

Dentro del fenómeno de luteinización se observan cambios en la ultraestructura de las células granulosa, de ellos lo más evidente es la formación de abundante retículo endoplásmico liso, la transformación de las mitocondrias, en las cuales sus crestas se tornan tubulares, aparecen abundantes gotas de lípidos en su citoplasma y los complejos de Golgi se hacen más evidentes. Todas estas modificaciones ponen de manifiesto la preparación de la estructura subcelular, para llevar a cabo la producción de progesterona. La progesterona tiene acción sobre varios órganos que se encuentran involucrados con la actividad reproductora, una de esas acciones es la de preparar al aparato reproductor para mantener un embarazo y nutrir al producto adecuadamente.

Se ha demostrado en diferentes especies de mamíferos, que el

cuerpo lúteo está constituido por células granulosas y células provenientes de la teca interna, ambas con actividad esteroidogénica. Morfológicamente han sido identificadas 2 poblaciones celulares en el cuerpo lúteo: a) Células lúteas grandes, polihédricas, referidas como granuluteínicas y b) células lúteas pequeñas o tecoluteínicas, además de tejido conectivo, en su mayoría fibroblastos y vasos sanguíneos (Mossman y Duke, 1973). Esta estructura lútea se mantiene en su fase secretora, en el caso de llevarse a cabo la fecundación, mientras se constituye otra fuente productora de progesterona, en la etapa denominada reconocimiento materno del embarazo.

En el caso de que no ocurriera la fecundación, este cuerpo lúteo degenera y es invadido por tejido conectivo, transformándose en el cuerpo blanco o albicans.

### **3. OSTIOGENIA DE LAS CELULAS ESTEROIDOGENICAS EN EL OVARIO DE LAS AVES.**

En la gónada femenina de las aves, se ha demostrado la presencia de cordones medulares bien delimitados por una lámina basal; estos cordones epiteliales hacia el 8o día de desarrollo embrionario, presentan ya una actividad esteroidogénica (Narbaitz y Adler, 1966, Weniger y Zeis, 1971 y Jordanov et al, 1978). Entre los cordones medulares, es posible reconocer la presencia de un sistema de conductos denominados lacunares (Callebaut, 1979), los cuales están delineados por una fina lámina basal que los envuelve.

Las estructuras epiteliales se encuentran distribuidas de manera irregular en la médula ovárica, de tal forma que en la región medular cercana a la corteza, denominada médula subcortical, se localizan cordones de células esteroidogénicas

relativamente pequeñas, así como reducidos canales lacunares. En la médula profunda se encuentran cordones de células esteroideogénicas de mayor tamaño, que corresponden a las células intersticiales del ovario.

Utilizando técnicas histoquímicas, se puso de manifiesto la presencia del colesterol y sus ésteres en el tejido esteroideogénico de las aves.

La presencia de la enzima  $3\beta$ -HSD, en los cordones medulares en el embrión de pollo, refleja la adquisición de una actividad esteroidea en etapas tempranas (Narbaitz y Kolodny, 1964, Scheib y Haffen, 1967 y 1969 y Scheib, 1970).

Existe gran controversia acerca de la formación de los componentes esteroideogénicos, existen por lo menos tres teorías diferentes sobre el posible origen de las células intersticiales, también denominadas "glándula intersticial" del ovario de las aves (Souin, 1902). Una de esas teorías propone que las células intersticiales se forman como protrucción de las células granulosas de los folículos atrésicos (Jordanov, 1978).

Otra de las teorías sobre el surgimiento de estas poblaciones encargadas de la biosíntesis de esteroides, se ala que se origina de cordones medulares primarios, organizados durante el desarrollo gonadal temprano (Benoit, 1950).

Por último, otros investigadores han puesto en evidencia el surgimiento de poblaciones esteroideogénicas a partir de células indiferenciadas del estroma ovárico (Stahl y Carlon, 1973).

A pesar de que existen estas evidencias, no se ha determinado el origen exacto de las poblaciones celulares que llevan a cabo la esteroideogénesis. Sin embargo, se ha planteado que las células esteroideogénicas en etapas tempranas del desarrollo folicular, responden a la LH y a la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG), segregando androstenediona y testosterona, y además se ha demostrado que estas poblaciones celulares presentan una

ultraestructura característica de células productoras de esteroides, en las cuales se presenta un abundante retículo endoplásmico liso (REL), mitocondrias caracterizadas por tener crestas de tipo tubular y numerosas inclusiones lipídicas (Pedernera, 1988). Las células intersticiales del ovario maduro se localizan en el estroma de la corteza del ovario o a nivel de la teca interna folicular. Estudios postnatales de las células intersticiales en la médula ovárica, muestran que estas células se incorporan a la teca de los folículos ovárico (Narbaitz y de Robertis Jr, 1968) y se ha reportado que responden ante el estímulo de la LH, en animales adultos (Huang y Nalbandov, 1979).

La teca en las aves, se encuentra diferenciada en dos capas, una porción interna vascularizada y otra externa donde no hay vasos sanguíneos, excepto en su borde más periférico. En la capa interna están presentes células intersticiales con características de células productoras de esteroides (Wells y Gilbert, 1988).

La teca interna, es compacta y de menor grosor que la teca externa, alrededor de un tercio. Se encuentra constituida por células fusiformes, alargadas, cuya apariencia es similar a fibroblastos (Dahl, 1971), presenta entre estas células, delicadas fibras de colágeno; también se localizan células esteroidogénicas típicas. Estas poblaciones celulares, a medida que crecen los folículos, van siendo más difíciles de identificar, ya que sufren compresión y se van haciendo más alargadas. Esta capa, conforme madura el folículo, se subdivide en tres regiones: una porción interna de fibras colágenas, una media donde hay predominantemente fibroblastos y una capa de células vacuoladas que contiene células esteroidogénicas (Wyburn et al, 1965).

Cabe hacer notar que la capa tecal, tanto interna como externa se modifica en su grosor y su estructura de acuerdo al grado de desarrollo de cada folículo.

En los folículos pequeños de aproximadamente 1mm de diámetro,

no se distinguen aún las dos capas tecales, pero en los folículos mayores, de aproximadamente 2mm, ya es posible identificar las dos regiones de la teca.

La teca externa, en general ocupa la mayor superficie de la capa tecal. La periferia de la teca externa se conecta y rodea de tejido cortical del ovario, donde se encuentra la llegada de una importante afluencia vascular. Esta capa se caracteriza por ser francamente fibrosa, está constituida por tejido conectivo fibroso compacto; las fibras corren paralelamente al diámetro folicular. Estas fibras se engrosan esto hace que se vean más cercanas a la teca interna. Entre las fibras se distinguen numerosos fibroblastos aplanados. Algunas fibras elásticas se encuentran localizadas entre los componentes de esta zona de la teca. Se ha demostrado, en esta capa tecal, la presencia de fibras musculares, aunque los autores no se ha puesto de acuerdo sobre la naturaleza de su composición (Hodges, 1974).

En la región del estigma, el patrón de las fibras que lo constituye es muy similar a la del resto del folículo, aunque se ha descrito a nivel ultraestructural, que en esa región existe una capa muy compacta de músculo liso (Dahl, 1970).

En la teca externa, se ha referido la presencia de nidos de células intersticiales llamadas luteas (Fell, 1925), que corresponden a la denominada glándula tecal (Dahl, 1970 a). De ellas se han hecho estudios ultraestructurales (Dahl, 1970 a y b y 1971) y se ha determinado que sus células están formadas por acúmulos de células epiteliales, que se localizan a todo lo largo del diámetro folicular. Estos acúmulos celulares se han descrito como formados por 2 tipos de células productoras de esteroides: a) células que se localizan hacia el interior del acúmulo, presentaron características ultraestructurales diferentes: abundantes inclusiones lipídicas, mitocondrias con crestas tubulares y numerosas especializaciones de membrana parecidas a

demosomas, y b) células "envolventes" que rodean a las primeras, por lo que están localizadas en la periferia de la glándula; se caracterizaron por ser alargadas, aplanadas, se les reconoció conectadas a través de numerosos desmosomas, no contuvieron lípidos en el interior de su citoplasma y presentan un retículo endoplásmico muy evidente. Finalmente esta glándula teocal se encuentra delimitada externamente por una membrana basal.

Los estudios de Dahl, 1970, han demostrado la inervación de esta glándula teocal; a ella llegan en forma de terminales nerviosas, las fibras en su mayoría de tipo amielínica, aunque algunas veces llegan mielinizadas. Esta inervación entra a la glándula y establece contacto con las células envolventes que se encuentran en la periferia. Así mismo se ha sugerido, que esta inervación es de tipo adrenérgico y colinérgico.

Se han identificado, en el grupo de las aves, a las células granulosas como un epitelio aplanado que rodea a los ovocitos primordiales. Conforme transcurre la diferenciación de los folículos, las células granulosas se incrementan en número y forman una sola capa de células cúbicas alrededor del ovocito, esto coincide con las etapas previas a la vitelogénesis. A diferencia de los mamíferos, en esta capa no se forma un antro folicular y sólo persiste como una capa única durante toda la vida del folículo (Wells y Gilbert, 1984).

A continuación, el epitelio folicular se desarrolla gradualmente y toma una apariencia de un epitelio pseudoestratificado. En el momento que se inicia la vitelogénesis, las células granulosas disminuyen de tamaño y reducen sus organelos. Posteriormente el arreglo pseudoestratificado de la capa granulosa es modificado nuevamente por el de un epitelio cúbico aplanado, durante esta etapa se incrementan los lípidos, que contienen principalmente triglicéridos y fosfolípidos, los cuales parecen corresponder a gránulos de vitelo.

Los estudios realizados sobre la actividad biosintética de hormonas esteroides en la capa granulosa aislada de folículos preovulatorios, demuestran que la secreción de progesterona es mayor en los folículos próximos a ovular, mientras que son inactivos desde el punto de vista de la esteroidogénesis, en folículos inmaduros (Huang et al, 1979 y Hammond, 1978). El ovario de las aves adultas se encuentra constituido por folículos en diferentes estadios de maduración, los cuales han sido clasificados, de acuerdo a su tamaño y al grado de avance en la maduración: a) Los folículos de la línea blanca, que son los que tienen un tamaño entre 2 a 5 mm y se encuentran esperando su turno para pasar a la siguiente categoría. b) Los folículos de la línea amarilla, en este grupo se encuentran los folículos preovulatorios, que se denominan en orden de maduración del F6 al F1, donde el F1 es el próximo a ovular y al que le faltan aproximadamente 24 hs para salir, por lo que en el grupo de las aves la ovulación ocurre diariamente (Wilson y Sharp, 1973 y Johnson y Van Tienhover, 1980 y 1981). A pesar de que en las aves no existe una diferenciación de un cuerpo lúteo al final del desarrollo folicular, dentro de los folículos postovulatorios permanecen, por unas cuantas horas, componentes celulares con actividad esteroidogénica, aunque la base de su funcionamiento no ha sido aclarado todavía (Hammond et al, 1980 y Marrone y Hertelendy, 1983).

#### **4. LA FUNCION ESTEROIDOGENICA EN EL FOLICULO OVARICO DE MAMIFEROS.**

El primero en reflexionar sobre la interrelación de la capa granulosa y la teca en el folículo antral maduro de la rata, en la secreción de estrógenos, fué Falk en 1959. El hizo estudios empleando autotransplante de fragmentos de granulosa y teca en la

cámara anterior del ojo. Con esta metodología valoró la producción de estrógenos de acuerdo a los cambios observados en el epitelio vaginal, ya que es el órgano blanco de los estrógenos. Como resultado de estas experiencias, sugirió la colaboración de dos poblaciones celulares en la producción de estrógenos e identificó a las células granulosa como fuente de un sistema productor de estrógenos muy relacionado con las células teca.

Posteriormente Short, en 1962 y 1964, observando los cambios producidos durante la esteroidogénesis en el ovario de la yegua, estableció que en la teca interna se producían estrógenos y que en este compartimiento era donde se originaba el sistema enzimático responsable de la aromatización de andrógenos a hormonas estrogénicas. Consideró que las células granulosa luteinizadas participaban, básicamente en la producción de progesterona, en vista de que en esa población celular existía una probable inhibición de las enzimas 17-hidroxilasa y de la 17,20-desmolasa. Experimentos subsiguientes en el ovario de equinos corroboraron, que la fuente principal de progesterona son las células granulosa. Además se logró determinar que son capaces de secretar pequeñas cantidades de 17 $\beta$ -estradiol (Channing, 1966 y Channing y Grieves, 1969).

Se demostró también que las células granulosa y teca están estrechamente relacionadas para llevar a cabo la función esteroidogénica.

Con la utilización de técnicas de cultivo y con incubaciones a corto plazo, se detectó que las células granulosa llevan a cabo la conversión de los andrógenos: testosterona y androstenediona a 17 $\beta$ -estradiol y estrona (Ryan y Short, 1965 y Channing, 1969).

Ante estas perspectivas, se intentó definir el sitio exacto en el que se lleva a cabo la secreción de estrógenos y con ésta finalidad se estudió el contenido del fluido de folículos de equinos; en su interior se detectaron grandes cantidades de

androstenediona, lo cual hizo pensar que podría ser uno de los precursores más importantes en la síntesis de estrógenos. Por otro lado, se determinó un incremento considerable en las concentraciones de  $17\beta$ -estradiol dentro del fluido folicular, proponiendo así la existencia de un sistema cooperador entre las poblaciones del folículo ovárico (Younglai y Short, 1970). Posteriormente, estos investigadores inyectaron precursores radioactivos: pregnenolona y androstenediona en el interior del folículo completo tomado de yegua durante la etapa de estró. A continuación recolectaron muestras del licor folicular con el fin de determinar las secreciones de las células granulosas y por otro lado hicieron muestras del contenido de la vena ovárica. Con estos experimentos pusieron en evidencia el metabolismo de los precursores C21 y C19. Proponen que el  $17\beta$ -estradiol deriva de un componente extrafolicular y que el sitio probable de su síntesis es la teca interna. Demostraron que las células granulosas de folículos pertenecientes a equinos tienen un activo sistema enzimático de la  $3\beta$ -HSD, aunque este parece tener una menor efectividad que lo reportado en otros estudios realizados "in vitro".

El modelo propuesto por Armstrong y Papkoff, 1976 y Fortune y Armstrong, 1977, para explicar la interrelación de los compartimientos foliculares en la producción esteroidea de mamíferos, han sugerido que las células tecales del folículo de rata mediante el estímulo de la LH producen andrógenos que son a su vez metabolizados por las células granulosas, las cuales previamente estimuladas por la FSH convierten, estos andrógenos en estrógenos. Evidencias similares son aportadas por Erickson y Ray, 1976, quienes demuestran en el conejo el papel de las células tecales, así como en estudios coincidentes en ovejas (Moore, 1977) y en humano (Tsang et al, 1979). En ovejas, se llevaron a cabo estudios usando anticuerpos en contra de testosterona, los que

inyectados a través de arteria ovárica, provocaron la suspensión de la producción estrogénica estimulada por la LH (Baird, 1977). Luego de casi 21 años de los primeros resultados obtenidos por Falk, en 1959, el conocimiento ha evolucionado, demostrando que los andrógenos son producidos y liberados a partir de una población de células tecales y que estos difunden hacia un segundo tipo celular que son las granulosa, para ser aromatizados y transformados en estradiol (Bjersing y Carstensen, 1964, Armstrong y Dorrington, 1977 y Bjersing, 1978).

A pesar los de trabajos previos, donde se mencionaba que la teca por sí sola secretaba estradiol (YoungLai y Short, 1970 y Channing y Coudert, 1976), donde eliminaban la capa granulosa de folículos de mono rhesus y continúan teniendo una producción activa de estradiol "in vitro"; sus resultados han sido criticados, ya que con la técnica empleada, pudieron haber quedado residuos de células granulosa en la preparación tecal.

Se ha visto que el efecto esteroidogénico de la LH sobre la teca, en el ovario de la rata (Bogovich y Richards, 1982), es el de incrementar la actividad de la  $17\beta$ -hidroxilasa: C-17, 20-liasa, para obtener como resultado la producción de compuestos esteroideos C-19 como la androstenediona y testosterona; aunque en las células tecales de mamíferos, el andrógeno encontrado con mayor abundancia es la androstenediona, esto probablemente debido a que existe una deficiencia en la enzima  $17\beta$ -hidróxiesteroide deshidrogenasa. Se ha visto que a medida que el folículo madura la biosíntesis de estos andrógenos es más selectiva, de tal modo que en los folículos preovulatorios próximos a ovular, la producción de ellos está más restringida (Lieberman et al, 1975)

Otro de los efectos de la LH sobre la teca, es la estimulación de la conversión del colesterol a progesterona, como lo prueban los experimentos realizados "in vitro" en folículos de rata en diferentes etapas de maduración. Los folículos al ser

estimulados con hCG (Bogovich y Richards, 1982) produjeron un incremento de receptores a LH y por consiguiente se estableció la producción de progesterona. Además pusieron de manifiesto que la liberación de progesterona, por las células aisladas de la teca de la rata, se incrementa con la estimulación del Adenosin monofosfato cíclico (cAMP); con esta serie de experimentos concluyen que la síntesis de progesterona está regulada hormonalmente y que varía durante la diferenciación de folículos, siendo mayor en los folículos preovulatorios.

Estos resultados ponen en evidencia la participación del compartimiento tecal dentro del folículo ovárico en los mamíferos, en la producción de andrógenos aromatizables y la síntesis de progesterona, ambos como respuesta al estímulo gonadotrópico de la LH, y cuya finalidad es la de almacenar y/o proveer de sustancias esteroideas al resto del folículo, para llevar a cabo la biosíntesis estrogénica (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

La participación de las gonadotropinas en la diferenciación del folículo ovárico, ha sido motivo de estudios durante varios años y una de las preocupaciones ha sido evidenciar el papel que juega el hipotálamo-hipófisis en la foliculogénesis en la gónada inmadura.

Estudios realizados por Challoner, (1975) en folículos de ovarios de hamster, los que fueron cultivados por varios días en ausencia de gonadotropinas; muestran que la diferenciación de estos folículos se vió retrasada considerablemente, además de que hubo poco desarrollo de las células granulosas, sugiriendo con esto la influencia de las gonadotropinas en la diferenciación de las células granulosas, aunque para algunos investigadores estos hallazgos necesitan ser analizados más a fondo (Peters, 1978).

En el mono hicieron experimentos para determinar la influencia de gonadotropinas durante la etapa fetal; se empleó la técnica de hipofisectomía en estos animales a los 114 y 117 días de

gestación, debido a que en esta etapa se inicia la foliculogénesis; la hipofisectomía provocó la disminución y casi una ausencia total de folículos en la etapa de mayor diferenciación, tanto en los folículos constituidos por varios estratos, como los antrales; así también hubo una reducción en el licor folicular en los folículos más avanzados, de esta manera se puso de manifiesto la participación de las gonadotropinas en la división celular del estrato granuloso y en la acumulación del líquido folicular.

En otros estudios llevados a cabo en ratones recién nacidos, se inhibieron las gonadotropinas empleando anticuerpos antigonadotropinas y se produjo una disminución importante en el desarrollo folicular y en la multiplicación de las granulosa por la carencia de hormonas hipofisarias en estos mamíferos.

Dentro de las funciones de la hormona luteinizante está la de producir un efecto sobre las células granulosa del folículo en crecimiento, desencadenando la producción de hormonas esteroideogénicas y como consecuencia desarrollan la capacidad de sintetizar pregnenolona a partir de la conversión del colesterol como respuesta al estímulo de la LH, según sugieren Hall et al, (1968), Dorrington et al, (1975), Armstrong y Dorrington, (1977) y Brodie, (1983). Esta conversión del colesterol a otros intermediarios, para dar como resultado hormonas sexuales, está regulado por un complejo sistema enzimático. Bersing y Cartensen, (1967), han puesto en evidencia que las células granulosa de folículos inmaduros obtenidos de cerdo, producen, bajo el efecto de la LH, una buena cantidad de progesterona y 20-hidroxipregnenolona a partir de pregnenolona, siguiendo la vía biosintética de los Delta 4 (Wells y Gilbert, 1984).

Se ha puesto en evidencia que la FSH y el estradiol "in vivo" puede actuar sobre las granulosa aumentando la síntesis de

progesterona; cabe hacer notar que estos procesos se ha visto que son modificados por la presencia de la FSH y LH, (Richards y Kersey, 1979), estas gonadotropinas tienen un efecto sinérgico a través de la maduración del folículo ovárico preovulatorio y además éstos mecanismos pueden modificarse debido a la presencia o ausencia de receptores para ambas gonadotropinas hipofisarias. Los cambios en el contenido de los receptores en las células granulosas puede determinar el tipo de respuesta ante cualquiera de las gonadotropinas. Se ha llegado a la conclusión de que en general las células granulosas presentan receptores a FSH y las células tecales intersticiales y luteas presentan receptores a LH.

Cabe hacer notar, que respecto a la regulación de la secreción de hormonas hipofisarias, al igual que los mamíferos, no se ha podido separar por completo el efecto producido por la FSH y la LH sobre el ovario de las aves (Teng et al, 1982).

En trabajos recientes se ha visto que la FSH, ante la presencia de andrógenos, puede participar activando el sistema de aromatasas y como consecuencia aumentar la síntesis de estradiol, por lo que se ha demostrado que este mecanismo enzimático es FSH dependiente, (Erickson y Haueh, 1978 y Moon et al, 1978). Esta actividad de aromatasas se ha determinado, en el interior de las células granulosas del folículo del ovario de los mamíferos, (Zeleznik et al, 1974). Estos hallazgos están apoyados por estudios "in vivo" hechos en ratas hipofisectomizadas a las que se les administró testosterona, produciendo como resultado un aumento en la aromatización del estradiol en el ovario, no así cuando se colocó la 5 $\beta$ -dehidrotestosterona, que es un andrógeno no aromatizable. Se ha detectado que los andrógenos ejercen un efecto estimulador sobre la producción de progesterona dentro del folículo preantral, a nivel de la población granulosa y se ha visto que depende de la presencia de receptores a LH (Lucky et al, 1977).

Recientemente la teoría bicelular explica la cooperación de las poblaciones celulares ováricas en la síntesis esteroidea, en base a que la LH regula la producción de andrógenos por las células tecales del ovario, especialmente la teca interna. Es importante señalar, que no solo las concentraciones de gonadotropinas en el suero pueden modificar la respuesta, sino que también la cantidad de sitios de unión hormona-receptor (H-R). Lo mismo ocurre con la FSH, cuyo efecto sobre las células granulosa se lleva a cabo primordialmente en la estimulación de aromatasas de los andrógenos como la testosterona y la androstenediona para la conversión a estrógenos, estradiol y estrona, respectivamente (Brodie, 1983).

Los estudios llevados a cabo para determinar el papel que juegan los estrógenos en la regulación de la esteroidogénesis intrafolicular en los mamíferos, han puesto de manifiesto la influencia inhibitoria que tienen sobre la biosíntesis de andrógenos en la teca, este efecto inhibitorio se ve reflejado en la disminución de la producción de las enzimas del sistema 17 $\beta$ -hidroxilasa:C-17,20-liasa. Esta regulación parácrina de los estrógenos, puede llevarse a cabo a través de un efecto de retroalimentación negativa intrafolicular, que limita su propia producción estrogénica a nivel del compartimento granuloso, por la escasez de andrógenos (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

Por otro lado, se ha evidenciado claramente que los estrógenos tienen la capacidad de potenciar su propia producción en las células granulosa. Con el fin de demostrar este mecanismo, se administró "in vivo" a ovarios de perros, citrato de clomifen (considerado como un estrógeno débil) y se detectó el aumento de la síntesis de estradiol y estrona empleando como precursores andrógenos marcados (Engels et al, 1968). Cabe mencionar, que se ha propuesto que los estrógenos pueden estar jugando un importante papel regulador, en el aumento de los estrógenos a

nivel de la aromatización de andrógenos y que esta regulación es dependiente del efecto FSH (Adashi y Hsueh, 1982).

##### 5. ESTEROIDOGENESIS EN EL FOLICULO OVARICO DE LAS AVES.

La diferenciación de las poblaciones esteroidogénicas y su influencia endócrina sobre la maduración de las glándula sexuales durante la etapa perinatal de las aves, se ha tratado de esclarecer. Así en el desarrollo temprano de la gónada femenina, se ha demostrado la presencia de cordones medulares en el ovario de las aves con actividad esteroidogénica, de tal forma que hacia el 80. día de desarrollo embrionario aparecen células que podrían llevar a cabo la biosíntesis de esteroides en la médula ovárica del pollo (Narbaitz y Adler, 1966 y Jornadov et al, 1978). Se ha reportado que esta secreción precóz persiste durante todo el desarrollo y es necesario para la diferenciación del oviducto (Willier, 1939).

En otros reportes, se ha visto que en los cordones medulares del ovario embrionario, en el pollo, ya se localiza una función esteroidogénica, como es la actividad del sistema enzimático encargado de la transformación de andrógenos a estrógenos por medio de la  $3\beta$ -HSD, que se lleva a cabo en la médula ovárica en la etapa embrionaria del pollo (Narbaitz y Kolodny, 1964, Sheib y Haffen, 1967 y 1969 y Woods y Erton, 1978). Asimismo, se han identificado células esteroidogénicas en el desarrollo temprano del embrión de pollo, por medio de técnicas ultraestructurales e inmunocitoquímicas como la inmunofluorescencia. Además estos autores describieron la presencia de estrona y  $17\beta$ -estradiol en el interior de la gónada indiferente, en ovarios de embriones de pollo de 3.5 días.

El empleo de precursores radiactivos, ha ofrecido ventajas importantes en la demostración de la biosíntesis de esteroides y en la detección de algunos sitios donde ocurre la esteroidogénesis en las aves. La aplicación de esta técnica a estudios realizados "in vitro", en el ovario del embrión de pollo, determinó la producción del 17 $\beta$ -estradiol y estrona desde el 7o día de su desarrollo prenatal, así también se demostró que el ovario libera estrógenos hacia el plasma (Haffen y Cedard, 1968, Weniger, 1971, Galli y Wassermann, 1973 y Guichard et al, 1973, Guichard et al, 1977 a y b y 1979 y Woods y Brazzil, 1981).

Por otro lado se ha empleado la técnica de radioinmunoensayo (RIA), para la demostración y cuantificación de la secreción de estas hormonas estrogénicas en las aves, (Guichard et al, 1977 a y b); la mayoría de las investigaciones han señalado al 17 $\beta$ -estradiol, como uno de los estrógenos mas importantes que interviene en la función reproductora de las aves; el 17 $\beta$ -estradiol juega un importante papel en la síntesis protéica, en la producción de los diferentes tipos de RNAs y la duplicación del DNA, interviene en la inducción del crecimiento del oviducto y la movilización del embrión de las aves dentro del huevo, (Gilbert, 1988).

En la gónada que se diferencia a testículo, principalmente se estimula la liberación de testosterona y DHT (dehidrotestosterona). Esto resulta interesante, ya que actualmente se sabe que alrededor del 6o día de desarrollo embrionario en el pollo, las gónadas indiferentes se diferencian hacia testículo o hacia ovario. En ovarios de 7.5 a 10 días, en el embrión de pollo, empleando como precursores marcados la dehidroepiandrosterona (DHEA) y testosterona (T), se evidenció la capacidad de síntesis y el aumento progresivo de estradiol (E2) y de estrona (E1), conforme el desarrollo del ovario avanza, poniendo en evidencia la maduración de este sistema de

esteroidogénesis a través de la diferenciación ovárica (Haffen y Cedard, 1968).

Estos hallazgos coinciden con los resultados obtenidos en embriones de mayor edad, donde a los 15 días el ovario produce T, E1 y E2 (Galli y Wassermann, 1972) y en gallinas adultas a las que se les administró precursores radiactivos, también se demostró la síntesis de progesterona (PROG), androstenediona o Delta 4, T y E2, de modo muy similar a lo que ocurre en la etapa embrionaria del pollo (Boucek y Savard, 1970).

Numerosos estudios morfológicos e histoquímicos han puesto en evidencia la presencia de acúmulos de células esteroidogénicas en la médula ovárica del embrión de pollo (Narbaitz y Kolodny, 1964, Narbaitz y Adler, 1966, Scheib y Haffen, 1967, Woods y Weeks, 1969 y Jordanov et al, 1978).

Por otro lado se ha empleado la administración de hormonas hipofisarias, con el fin de poner en evidencia el papel que juega este tejido esteroidogénico dentro del ovario de las aves, de tal forma que con el tratamiento de la LH y la hCG, se ha podido evaluar la biosíntesis de esteroides en los estadios embrionarios, tanto "in vivo" como "in vitro", los resultados obtenidos de estos experimentos se ven reflejados en un aumento del estradiol, progesterona y la testosterona en embriones de 8 a 18 días, como se ha referido en los trabajos clásicos de Teng y Teng (1977a y b, 1979), Teng, 1982, Teng et al, 1982, Guichard et al, (1979) y Woods et al, 1981).

El empleo de precursores marcados para analizar la biosíntesis del estradiol y estrona, combinado con la utilización de hormonas hipofisarias LH y hCG para despertar una respuesta ovárica, se ha usado en embiones de pollo entre los 10 y 18 días, logrando un incremento en E2 y E1 (Cedard et al, 1968). La administración de LH se ha visto que tiene un efecto sobre la secreción de estradiol y desde la etapa embrionaria en el ovario

del pollo alrededor de los 7.5 y 9 días es posible detectar un incremento de E2 en el plasma (Woods, et al 1981). De tal modo que es posible encontrar cambios morfológicos en el ovario producidos desde etapas tempranas del desarrollo embrionario. Estos cambios pueden ser modificados por la presencia de la LH o la hCG, ya que se ha visto que la biosíntesis de esteroides es dependiente de la estimulación con FSH y LH.

Con el empleo de técnicas de gradientes de densidad, se ha logrado tener información de la función biosintética de las poblaciones esteroidogénicas que conforman el ovario al nacimiento. Durante este proceso, se llevo a cabo una separación mecánico-enzimática de las células responsables de la esteroidogénesis del ovario. Se aislaron básicamente dos tipos celulares: Una población de células que en su mayoría pertenecían a la médula ovárica, con características ultraestructurales de células productoras de esteroides, las cuales mostraron una poca o nula actividad de aromatasas para la biotransformación de los andrógenos, por lo que no hubo síntesis de  $17\beta$ -estradiol, en cambio al medir la liberación de hormonas esteroides se demostró la secreción de testosterona. En la otra población celular se identificaron mayoritariamente células poco diferenciadas, con una evidente actividad del sistema de aromatización y se observó la producción de  $17\beta$ -estradiol y estrona, aunque esta última se produjo en mayores concentraciones, por lo que se presume que la enzima que cataliza esta reacción, la  $17\beta$ -HSD tiene baja actividad (Pedernera et al, 1988).

Se han identificado, en los folículos del ovario de las aves, por lo menos dos poblaciones con actividad biosintética esteroidea: 1) Las células granulosas que responden inicialmente al estímulo de la FSH y que posteriormente al madurar desarrollan e incrementan su respuesta a la LH, produciendo progesterona. Y 2) Las células tecales que reciben el estímulo de la LH y responden

produciendo estrógenos y andrógenos, pero a medida que se diferencian los folículos decrece la sensibilidad de la teca al efecto estimulatorio de la LH (Huang y Nalvandov, 1979 y Hammond et al 1981).

Se ha puesto en evidencia que la sensibilidad al estímulo de la LH decrece al madurar el folículo de las aves (Marrone y Hertelendy, 1983), de tal forma que la población tecal del folículo F3 tiene una mejor respuesta hacia la LH, que la teca del folículo por ovular o F1. La mayor sensibilidad al efecto de la LH, se ha probado tomando en cuenta la mayor capacidad para aromatizar los andrógenos a estrógenos. Esta sensibilidad a la gonadotropina LH, no es lo único que se modifica en el proceso de maduración folicular, además durante la diferenciación, puede haber una importante disminución en el número de receptores a FSH, en los folículos preovulatorios más avanzados, como son el F2 y F1 (Etches y Cheng, 1981).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .

A pesar de que se cuenta actualmente con una vasta literatura sobre la actividad esteroideogénica del ovario en las aves, no se ha esclarecido aún cuales son las poblaciones celulares que intervienen en la biosíntesis de esteroides dentro del ovario, además de que no se sabe como es que se modifican esas poblaciones esteroideogénicas a través de la diferenciación del folículo ovárico.

Si bien es cierto que dentro de la diferenciación de la gónada femenina en las aves se ha visto que ejercen una gran influencia las gonotropinas hipofisarias, y que a partir de su estímulo provocan un aumento en la producción de estrógenos, tanto 17 $\beta$ -estradiol como estrona, en el ovario, entonces resultaría importante aclarar el papel que desempeñan las gonadotropinas hipofisarias : FSH y LH, sobre las poblaciones esteroideogénicas del ovario de las aves al nacimiento y de esta manera determinar con mayor exactitud sobre que tipos celulares recae el efecto hormonal.

Otro de los hechos importantes que sigue sin resolver es si en las aves existe un sistema cooperador entre las células productoras de esteroides, por lo que a continuación de identificar cuáles serían las poblaciones involucradas en la biosíntesis, se establecería cómo es que interactúan dichas poblaciones dentro del folículo ovárico, en las diferentes etapas de maduración.

De acuerdo a todas estas consideraciones se planteó la posibilidad de identificar las poblaciones esteroideogénicas en el ovario del pollo al nacimiento.

Se utilizará la administración de la hormona gonadotrópica coriónica humana (hCG) en la etapa embrionaria, con el fin de valorar los cambios estructurales producidos en esas poblaciones

productoras de esteroides al nacimiento.

Por otro lado se estudiarán secuencialmente los cambios morfológicos que se llevan a cabo en las poblaciones esteroidogénicas, durante el desarrollo de los folículos, utilizando como modelo el ovario del pollo en diferentes edades postnatales.

En vista de que se sabe que en el folículo preovulatorio de las aves, la teca de tiene capacidad productora de andrógenos (testosterona y androstenediona) y estrógenos (17 $\beta$ -estradiol) y que la capa granulosa básicamente secreta progesterona, se observarán las modificaciones estructurales de las poblaciones celulares encargadas de la producción esteroidea en los folículos preovulatorios en la gallina adulta.

## **HIPOTESIS**

Existen reportes sobre la presencia de células involucradas en la biosíntesis de esteroides en el ovario de las aves, durante la etapa embrionaria (Hodges, 1974, Narbaitz y Adler, 1966 y Jordanov et al, 1978). Asimismo, se ha demostrado que los cordones medulares del ovario de pollo tempranamente desarrollan una respuesta positiva a la actividad de la 3 $\beta$ -HSD (Scheib y Haffen, 1967 y 1969). Así también se sabe que en el ovario del embrión de pollo, ya existe una producción de estrógenos, tanto de 17 $\beta$ -estradiol como de estrona (Galli y Wassermann, 1973). Considero que estas subpoblaciones se pueden reconocer en el ovario del ave recién nacida e identificar sus relaciones estructurales y las modificaciones que sufren cuando reciben un estímulo gonadotrópico.

Se ha propuesto que en el ovario de las aves recién nacidas existen dos subpoblaciones de células esteroidogénicas (Pedernera et al, 1988).

Luego del nacimiento, se ha descrito que los cordones medulares se insinúan alrededor de la capa granulosa para formar la teca de los folículos ováricos (Dahl, 1970 y Hodges, 1974). Se puede postular que las subpoblaciones de la médula participarán en la integración de la capa tecal y qué se producirán cambios en esas subpoblaciones durante la foliculogénesis.

La producción de esteroides en el ovario de la gallina, se ha visto que está regionalizada, de tal modo que en la teca se producen estrógenos (17 $\beta$ -estradiol) y andrógenos (testosterona), (Huang y Nalvandov, 1979 y Marrone y Hertelendy, 1985) y en la capa granulosa se secreta principalmente progesterona (Huang, et al, 1979, Hammond et al, 1980 y Wells et al, 1981). Si esto es cierto, se tendrán que reconocer en la teca, por lo menos dos poblaciones celulares que participen en la producción de estrógenos y testosterona, estas poblaciones van a encontrarse en

la teca del folículo y posiblemente sean las derivadas de las subpoblaciones de células esteroidogénicas que se identifiquen en el ovario inmaduro.

## **OBJETIVOS**

Uno de los primeros objetivos a seguir en este trabajo de tesis va encaminado a la identificación de las poblaciones celulares que tienen a su cargo la biosíntesis esteroidea en el ovario de las aves, al nacimiento.

A continuación se estudiarán los cambios estructurales a nivel subcelular que se producen en los cordones medulares esteroidogénicos como respuesta al efecto gonadotrópico de hCG.

En una segunda etapa se propone reconocer a las distintas poblaciones celulares y los cambios que de manera secuencial se producen en ellas conforme transcurre la foliculogénesis. Observando la integración de estas poblaciones productoras de esteroides a las tecas de los folículos en maduración.

Otro de los objetivos es el de poner en evidencia los cambios morfológicos de las poblaciones esteroidogénicas que se llevan a cabo durante el proceso de maduración de los folículos preovulatorios del ovario adulto.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **OBTENCION DEL MATERIAL.**

Se emplearon huevos fertilizados de la línea Leghorn blanca obtenidos de la granja avícola "La Veracruz" de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., se colocaron a 37.8 C en una incubadora de aire forzado y humedad controlada.

Después de la eclosión, los pollitos fueron criados con temperatura controlada de acuerdo a los manuales de crianza de aves y alimentados "ad libitum" con Startina (Purina) . Los pollos se sacrificaron por decapitación a diferentes edades: 0, 7, 15, 21, 28 y 36 días posteclosión, diseccionando el ovario izquierdo.

Para el estudio de los folículos en el ovario maduro, se emplearon gallinas ponedoras jóvenes, de aproximadamente 5 meses de edad; a las que se controlaba diariamente la hora de la ovoposición.

Las gallinas fueron sacrificadas por decapitación, de 6 a 8 hs después de la ovoposición para la obtención de folículos. Estos se identificaron y diseccionaron cuidadosamente del ovario. Los folículos prevulatorios de la línea amarilla se clasificaron de F1 a F6 en orden decreciente de diámetro.

### **PROCESAMIENTO DEL MATERIAL PARA MICROSCOPIA DE LUCE Y ELECTRONICA DE TRANSMISION.**

Los ovarios izquierdos de los pollos recién nacidos sacrificados dentro de las 24 hs posteclosión, así como los fragmentos de los ovarios obtenidos de las pollitas en las edades antes mencionadas del desarrollo posnatal, se fijaron por inmersión en glutaraldehido. En el caso de los folículos de gallinas ponedoras, la fijación de cada uno de ellos se hizo también por inmersión en glutaraldehido, durante 10 min;

posteriormente se les hizo una pequeña incisión por donde se les inyectó fijador; para asegurar su penetración al interior. A continuación los folículos se fragmentaron y se seleccionaron áreas representativas de cada uno.

Todo el material obtenido se procesó con la técnica de microscopía electrónica, siguiendo el esquema que a continuación se describe.

Una vez obtenido cada uno de los especímenes; fueron fijados inmediatamente por inmersión. En el caso de los experimentos de los ovarios del pollo recién nacido, se empleó glutaraldehído en amortiguador de fosfatos 0.15 M a un pH de 7.4 por 2hs a temperatura ambiente. En los demás experimentos realizados, las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de cacodilato de sodio 0.15 M a pH 7.4, durante 2 hs a temperatura de 4 ° C.

A continuación se lavaron con el amortiguador correspondiente y se postfijaron con tetraóxido de osmio al 1% en amortiguador de fosfatos o de cacodilato de sodio 0.15 M pH 7.4 según el caso, por un lapso de 2 a 3 hs a temperatura ambiente. La deshidratación se realizó con una serie creciente de alcoholes y por último con óxido de propileno. Las muestras de los ovarios de pollo recién nacidos, se preincluyeron en una mezcla de óxido de propileno y epón 1:1 durante 12 a 14 hs, después se pasaron a otra mezcla con mayor concentración de resina epóxica por un lapso de 12 hs. Finalmente los fragmentos de ovarios se pusieron en la resina sin el solvente durante 4 a 6 hs y fueron incluidas en epón 812 (Merck), en la estufa a 60 ° C por 24 a 48 hs. En el resto de los experimentos, se llevó a cabo la preinclusión con mezclas de óxido de propileno y resina epóxica Poly/Bed (Polyscience), aumentando la concentración de la resina. A continuación, las muestras se incubaron en la resina sola por 4 hs y se procedió a la inclusión. Durante la polimerización se incrementó gradualmente

la temperatura cada 12 hs; primero a 35 °C durante 12 hs, después a 45 °C por otras 12 hs, alcanzando su completa polimerización luego de 12hs a 60 °C.

Posteriormente de este material se hicieron cortes de 1  $\mu$ m de grosor, empleando un ultramicrotomo MT-1 (Porter-Blum) y un Ultracut, (Riechler), para la identificación de las áreas se tiñeron con azul de toluidina. De las zonas elegidas se hicieron cortes finos dorados y grises. Se contrastaron con acetato de uranilo acuoso o alcohólico y citrato de plomo (Reynolds, 1963) y por último fueron analizados y fotografiados con un microscopio electrónico de transmisión EM9-S2, Karl Zeiss.

#### **TRATAMIENTO HORMONAL.**

En una serie de experimentos se efectuó un tratamiento con gondotropina coriónica humana (hCG), durante su incubación. Los embriones al cumplir los 13 días fueron inyectados con una dosis de 1.0 IU/ml de hCG (Pregnil) del laboratorio Organon, disuelta en una solución de cloruro de sodio 0.9 % y a los 15 y 17 días de incubación se les repitió la misma dosis. Siguiendo el mismo esquema, al grupo testigo de animales se le inyectó solamente la solución de cloruro de sodio 0.9%. Finalmente a un grupo de embriones se les administró una dosis única de hCG en el día 17 de la etapa embrionaria. La técnica empleada para la administración consistió en hacer una pequeña abertura en la cáscara y sobre la membrana corioalantoidea, mediante la cual se les colocó la hormona. Los animales testigo y tratados con la hormona fueron sacrificados dentro de las primeras 24 hs después del nacimiento. Se les disecó el ovario izquierdo y se cuantificó el contenido total de proteínas o se emplearon para realizar los estudios morfométricos.

#### **A) Análisis de proteína total.**

Para el análisis de proteína total, los ovarios izquierdos de los pollos recién nacidos se pesaron cuidadosamente y homogeneizaron con el fin de determinar el contenido total de proteína empleando la técnica de Lowry et al, 1951, para ello se empleó como estandar albumina bovina (fracción V) (Sigma),  $A = 279.5 = 6.67 \text{ cm}^{-1}$ .

#### **B) Estudio Morfométrico.**

El estudio estructural de los especímenes de los ovarios de las pollitas recién nacidas tratadas hormonalmente, se realizó con microscopía de luz y electrónica de transmisión. Se estudiaron las siguientes áreas del ovario : a) La corteza ovárica, donde se localizan las células germinales y los folículos en formación. b) La médula subcortical, donde se encuentra la principal acumulación del tejido esteroidogénico, los canales lacunares y vasos sanguíneos. c) La médula profunda, en la que existen principalmente, acúmulos de las células intersticiales del ovario. Empleando la microscopía de luz, se midió un área total de  $540 \text{ um}^2$  con el método de puntos, con una precisión de 95 % (Williams, 1977). Se cuantificó el área ocupada por los cordones de células intersticiales y el área ocupada por los canales lacunares. Se contó el número total de células germinales localizadas en el estroma medular subcortical. Las diferencias entre testigos y tratados se analizaron estadísticamente utilizando el análisis de variancia (F), la prueba de t de Student y la prueba de Scheffe (1953) para contrastes múltiples.

Para el análisis morfométrico a nivel de microscopía electrónica se obtuvieron 12 micrografías seleccionadas al azar de cada uno de los ovarios. Para estandarizar el análisis morfométrico con microscopía electrónica, las micrografías fueron

tomadas a bajos aumentos (1,800 X). Para la medición de mitocondrias se utilizaron ampliificaciones de las áreas seleccionadas (45,000 X). Las mediciones de las áreas fueron llevadas a cabo en una computadora Hewlett Packard modelo 9825 T acoplada a un digitalizado HP 8974A. Se midió el volumen ocupado por los cordones medulares, vasos sanguíneos y lacunares, además de la cantidad de ovocitos localizados en el ovario de los grupos testigo y experimentales.

Se obtuvieron folículos preovulatorios F5, F4 y F3 de gallinas adultas, Leghorn blancas, entre las 48 y 52 semanas de edad. A los folículos se les eliminó la capa granulosa y el tejido conectivo que rodea a la teca. El tejido tecal, se disoció con tripsina al 2.5 % en una solución salina balanceada libre de calcio y magnesio, a 37 °C y con agitación (90 ciclos/min). Las células tecales se dispersaron después de 30 min de tratamiento con la tripsina; con el fin de eliminar los fragmentos de tejido, se filtraron a través de una malla de nylon. La actividad enzimática de la tripsina, se detuvo con inhibidor de tripsina disuelto en medio de cultivo Eagle Dulbecco modificado (DMEM) y solución salina balanceada (BSA), en una concentración de 2.5 mg/ml, a continuación las células se lavaron dos veces con DMEM-BSA. Las células aisladas de la teca (30-50 x 10 células), se colocaron en un gradiente continuo de Percoll (0-100 %), se centrifugaron a 1500 xg por 15 min y las fracciones celulares se colectaron de la parte superior del tubo de centrifugación. Las fracciones que contenían las células tecales se lavaron con 10 ml de DMEM-BSA. El número de células se contó en cada fracción empleando para ello un hemocitómetro, además se analizó la viabilidad celular, utilizando como colorante de exclusión el azul de tripano, en todas las muestras la viabilidad fue de aproximadamente 95 %. Posteriormente, se cuantificó en las células tecales la capacidad de síntesis del 17 $\beta$ -estradiol y la

testosterona, para lo cual se incubaron aproximadamente  $(1 \times 10^6)$  cel/ml, durante 2 hs en 1ml de DMEM-BSA con 0.1 mM de 1-metil 3-isobutil xantina (MIX) y 1.0 UI de hCG, las células fueron incubadas a 37 C en un baño de agitación (90 ciclos/min), bajo una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de oxígeno. Aliquotas conocidas del medio, se colectaron y en ellas se midió 17 $\beta$ -estradiol y testosterona por la técnica de radioinmunoanálisis. De tal forma que se valoró la secreción basal y estimulada con hCG de estas hormonas.

## RESULTADOS

### IDENTIFICACION DE LAS POBLACIONES ESTEROIDOGENICAS EN EL OVARIO DEL POLLO AL NACIMIENTO.

En el ovario del pollo al nacimiento se presenta una región cortical y una medular, dentro de la corteza es posible encontrar las células germinales formando conglomerados o nidos y algunas en forma aislada; la mayoría de las células sexuales se encuentran en el estadio de ovocitos primarios, ya que se ha iniciado la primera división meiótica, a pesar de ello, se pueden aún reconocer algunas ovogonias. Entre los ovocitos se localizan células prefoliculares que poco a poco van rodeándolos hasta formar la capa granulosa (fig 1a, p 164 del 1er artículo anexo), que en las aves está formada por un epitelio plano.

En la médula del ovario del pollo recién nacido se identifica una zona contigua a la corteza que se denomina médula subcortical y otra zona más periférica que corresponde a la médula profunda (fig 1a, p 164 del 1er artículo anexo). En la médula subcortical se han determinado la presencia de por lo menos tres poblaciones celulares que tienen participación en la biosíntesis de esteroides: 1) cordones epiteliales irregulares de células intersticiales, en cada uno de estos cordones intersticiales se distingue una terminación nerviosa que penetra entre las células, ultraestructuralmente se han identificado como productoras de esteroides, por presentar un abundante retículo endoplásmico liso (REL), mitocondrias con crestas tubulares y con numerosas inclusiones lipídicas. 2) Es posible localizar cordones de células denominadas poco diferenciadas debido a la organización de sus organelos, puesto que presentan un retículo endoplásmico rugoso (RER) muy desarrollado, un aparato de Golgi evidente, numerosos polirribosomas dispersos en su citoplasma y mitocondrias con crestas transversales; los lípidos son escasos o ausentes en esta población celular. 3) La tercera población epitelial, localizada

en menor proporción en la médula ovárica, se encuentra formando los canales lacunares y su morfología es muy parecida a la determinada para la población de poco diferenciadas (fig 1a, c, p 164 del 1er artículo anexo). Entre estos cordones epiteliales se distinguen en la médula subcortical abundantes vasos sanguíneos y este sistema lacunar bien definido, también es posible reconocer algunos ovocitos aislados que se insinúan entre la médula ovárica, (figura 1a, b, p 164 del artículo anexo).

#### **EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE LA HORMONA hCG.**

El ovario izquierdo de los pollo recién nacidos tratados con hCG desde el día 13 del desarrollo embrionario, hasta completar las tres dosis administradas, reflejó un incremento significativo en el contenido total de proteínas (Tabla 1, p 163 del 1er artículo anexo), no obstante que las diferencias del peso seco determinados entre los grupos no fueron significativas.

Como resultado de la administración de la hormona hCG, aparentemente en la corteza del ovario del pollo recién nacido no hubo cambios observables, a diferencia de la médula donde se identificaron modificaciones relevantes: se detectó un aumento en la vascularización tanto de las venas como de los vasos capilares en la médula profunda del grupo testigo (ver la figura 1, p 164 del 1er artículo anexo). Dentro del sistema lacunar se presentaron también cambios, de tal manera que hubo un mayor desarrollo en los canales lacunares de los testigos (ver figura 1a, b, p 164 del artículo anexo). Estas modificaciones detectadas sobre el sistema vascular y los conductos lacunares fueron evaluadas y los resultados se refieren en el texto del artículo (ver la tabla 2, p 165 del 1er artículo anexo).

Dentro del estroma de la médula subcortical del ovario se localizaron ovocitos primarios contiguos al sistema de lacunares y dentro de estos conductos como se demuestran en el trabajo referido (figura 1a, c, p 164 del 1er artículo anexo), de igual

manera los ovocitos se encontraron en la corteza del ovario en estrecha relación con las células prefolículoares (fig 1a, p 164 1er del artículo anexo). En los ovarios tratados con hCG, el número total de células germinales, encontrados en el estroma ovárico, se redujo considerablemente.

Las mediciones se llevaron a cabo sobre los cordones medulares de células reconocidas como poco diferenciadas, sobre los vasos sanguíneos y sobre las células germinales localizadas en la zona medular profunda, de tal manera que después del tratamiento con hCG, el volumen de los cordones de células intersticiales se incrementó, y con respecto a las células poco diferenciadas que se encontraron contiguas a los cordones de células intersticiales, también se modificaron en su estructura ante la administración de la hCG (fig 1c, d, p 164 del 1er artículo anexo). Esta modificación consistió en la transformación de células poco diferenciadas a células intersticiales maduras, de tal modo que esa conversión se ve reflejada en un incremento de la población intersticial observada después del tratamiento con hCG (Tabla 2, p 165 del 1er artículo anexo).

#### **ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL Y MORFOMETRICO.**

En los ovarios del pollo al nacimiento se ha visto la presencia del epitelio superficial bien delimitado, hacia el interior del ovario se observa la capa cortical en la que se encuentran los ovocitos y alrededor de ellos las células prefolículoares. La corteza ovárica se encuentra delimitada por una fina capa albugínea que en su mayoría está constituida por fibroblastos (fig 1a, p 164 del 1er artículo anexo).

En la médula del ovario al nacimiento se reconocen dos regiones, una médula subcortical, localizada en cercanía con la corteza del ovario donde se localizan cordones de células poco diferenciadas, pequeños islotes de células esteroidogénicas y canales lacunares. En la médula más profunda o interna se

distinguen grandes islotes de células esteroidogénicas y canales lacunares con mayor tamaño; de tal modo que los cordones de células poco diferenciadas no se localizaron en la médula profunda.

En la médula subcortical del ovario, los tres componentes esteroidogénicos que se modifican ante el efecto de la hCG, son : las células esteroidogénicas típicas, las células poco diferenciadas y las células del sistema lacunar, como se muestra (fig 1a, p 666 del 2do artículo anexo).

Las células esteroidogénicas se encuentran aisladas o formando acúmulos celulares de diferente tamaño, denominados cordones de células intersticiales. Las células esteroidogénicas de acuerdo a su ultraestructura, presentan las características de células productoras de esteroides como se mencionó anteriormente (figura 1a, b , p.666 del 2do artículo anexo). Estos cordones esteroidogénicos se encuentran en su mayoría rodeados por una lámina basal discontinua y en los sitios donde esta lámina está ausente se localizan proyecciones finas de fibroblastos adyacentes o fibras de colágena, que suplen esa discontinuidad (figura 1 a p.666 del 2do artículo anexo). Entre las células de esteroidogénicas se identifican complejos de unión tipo desmosoma y uniones comunicantes que las mantienen interrelacionadas (fig 1b, p 666 del 2do artículo anexo). Estos cordones esteroidogénicos por lo regular reciben una terminación nerviosa libre (fig 1, p 666 del 2do artículo anexo).

Con respecto a los cordones o nidos de células poco diferenciadas siempre están bordeados por una lámina basal bien definida, a todo lo largo del cordón. Entre las células que componen el acúmulo se pueden reconocer espacios de diferentes dimensiones. Las características estructurales que presentan estos componentes celulares son: un citoplasma escaso con abundantes polirribosomas, retículo endoplásmico rugoso (RER), aparato de

Golgi bien desarrollado, mitocodrias con crestas transversales; presentan un núcleo redondeado u ovoide con eucromatina evidente y un nucleolo prominente (fig 2, p 666 del 2do artículo anexo). Los lípidos pueden estar presentes, o no, en el citoplasma de este componente celular, que se presenta en mayor proporción dentro de la médula ovárica.

El tercer componente epitelial localizado en la médula ovárica es el sistema de canales lacunares, que se originan de la vacuolización de algunos de los cordones medulares ; estos conductos lacunares se constituyen por una sola capa de células epiteliales que los rodean, cabe señalar que estos canales lacunares, también están delimitados externamente por una lámina basal tortuosa. Hacia la luz de los canales lacunares, entre estas células se reconocen uniones intercelulares características de tipo de zonula adherens (fig 3, p 666 del 2do artículo anexo), que mantienen una íntima relación entre las células. La organización subcelular de estas células, resultó ser muy similar a la observada en la población celular de poco diferenciada, por lo que en algunas ocasiones la diferenciación de ambas poblaciones se hace difícil (fig 3, p 666 del 2do artículo anexo).

#### **CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES DE LAS POBLACIONES ESTEROIDOGÉNICAS PRODUCIDOS DURANTE EL EFECTO DE LA hCG.**

Los estudios ultraestructurales de la población esteroideogénica demostraron la diferenciación de esta población, de tal forma se presentaron cambios como respuesta al tratamiento de la hCG, estas modificaciones se vieron reflejadas sobre todo en un aumento del área del citoplasma. No se modificó el área del núcleo (Tabla 1, p 667 del 2do artículo anexo). En el citoplasma de estas células se localizan numerosas vesículas de retículo endoplásmico liso (REL) (Fig 4, p 668 del 2do artículo anexo) . Lo lípidos presentan tendencia a estar aumentados, pero no llega a ser significativa. Las mitocondrias con crestas tubulares,

aumentaron de tamaño, con respecto al grupo testigo (Tabla 1, p 667 del 2do artículo anexo). Las mitocondrias de las células esteroideogénicas resultaron ser de mayor tamaño que las de las células poco diferenciadas (Tabla 1, p 667 del 2do artículo anexo).

En los cordones de células poco diferenciadas ubicadas en la médula (fig 4, 5 y 6, p 668 del 2do artículo anexo), también respondieron ante la estimulación de la gonadotropina, de tal modo que se produjo un aumento significativo del área del RER, además de que se ocasionó un incremento en el área promedio /por organelo de las mitocondrias (Tabla 1, p 667 del 2do artículo anexo).

La presencia de células transicionales, entre la población esteroideogénica y la de células poco diferenciadas, se hicieron evidentes en la médula del ovario (fig 7, p 668 del 2do artículo anexo). Los organelos característico de esta población son, abundantes vesículas de REL, mitocondrias con crestas tubulares, e inclusiones lipídicas en el interior del citoplasma de éstas células (fig 7, p 668 del 2do artículo anexo), las cuales están delimitadas por su lámina basal. Las poblaciones que se encuentran en el sistema lacunar, también se modifican ante el estímulo de la hCG (fig, p 668 del 2do artículo anexo), produciendo un aumento en las mitocondrias y un incremento en las cisternas del RER (Tabla 1, p 667 del 2do artículo anexo).

#### **EVOLUCION DE LAS POBLACIONES ESTEROIDOGENICAS EN**

##### **LAS ETAPAS POSTNATALES DEL OVARIO DE POLLO.**

**Ovario de pollita en la etapa de siete días después de la eclosión.**

La corteza del ovario del pollo, al séptimo día de desarrollo postnatal, comienza a interactuar con la médula subcortical; en vista de que comienza a desaparecer la fina capa

albugínea que separa a la corteza de la médula. Al mismo, podemos reconocer las poblaciones esteroideogénicas que se están organizando para formar el resto de la pared folicular, o sea la porción teca del folículo en desarrollo. Cabe hacer notar que en esta etapa en el ovario del pollo, las poblaciones que se van a integrar al folículo, siguen siendo las mismas que se describieron para los animales al nacimiento: una población de células poco diferenciadas, la población de esteroideogénicas y las células que constituyen el sistema lacunar (fig 1 y 2).

Los folículos están constituidos por un epitelio cúbico de células granulosas, que rodean al ovocito. A continuación se encuentra una membrana basal que delimita todo el contorno de la capa granulosa y por el otro extremo está en contacto directo con una delgada capa de fibroblastos, que marca el inicio de la teca interna en formación (fig 1 y 2).

Los cordones epiteliales de células poco diferenciadas, delimitados por una lámina basal continua, se acercan a los folículos (fig 1) y se van recorriendo poco a poco hacia la pared folicular, de tal modo que se disponen a continuación de la capa de fibroblastos que rodea a los folículos (fig 1 y 2). Las características ultraestructurales de este tipo celular se conservan, durante este estadio. Es posible observar células transicionales, ocupando su lugar alrededor del folículo primordial, entre las células poco diferenciadas.

Los cordones de células esteroideogénicas, mantienen sus características de células productoras de esteroides, pero éstas se ubican, sobre todo en la periferia de los folículos y en el estroma ovárico, de tal forma que aparentemente quedan fuera de los folículos. En esta edad, se pueden distinguir en el estroma ovárico y entre los folículos, cordones de células poco diferenciadas y algunos islotes de células de esteroideogénicas (fig 1).

Es interesante hacer notar, que los islotes de las poblaciones esteroideogénicas, así como los cordones de células poco diferenciadas reciben inervación en forma de terminaciones libres (fig 1 y 2).

El componente lacunar, continúa formado por las células epiteliales, con características ultraestructurales muy parecidas a las células poco diferenciadas. Las células de los lacunares, se encuentran también, delimitados externamente por una lámina basal continua y sinuosa; estos migran hacia los folículos para integrar el resto de la pared folicular (fig 1 y 2).

Entre estas poblaciones esteroideogénicas, es posible reconocer el tejido conectivo, formado principalmente por fibroblastos y delgadas fibras de colágena, que también se empieza a organizarse para formar la capa tecal del folículo. De igual modo, junto con estos componentes ováricos se comienzan a insinuar los vasos sanguíneos entre las células esteroideogénicas. Este sistema de capilares, durante esta etapa, tienen una gran actividad en vista de que se está integrando la teca interna vascular del folículo (fig 1 y 2).

#### **Etapas de 15 días después del nacimiento.**

En el ovario de pollitas a los 15 días después de la eclosión, se distingue una mayor organización de los folículos. Las poblaciones que formaban el componente epitelial del ovario al nacimiento, se han reorganizado de tal manera que es posible reconocer a los cordones de células esteroideogénicas típicas entre los folículos y en el estroma del ovario formando cordones de células intersticiales, por lo que es evidente que estas células intersticiales del ovario no participan en la constitución del folículo (fig 3).

Los cordones de células poco diferenciadas, junto con islotes de células transicionales, que se han comenzado a diferenciar a partir de las poblaciones de células poco

diferenciadas (fig 3), muy probablemente debido a un estímulo de LH provocado durante la diferenciación folicular, se empiezan a mover hacia los folículos, hasta ubicarse en cercanía de la capa delgada de fibroblastos que envuelve a la capa granulosa (fig 4). En estos cordones de células poco diferenciadas se distinguen frecuentemente, imágenes mitóticas (fig 3), que sugieren la proliferación de estos cordones .

Los canales lacunares se distinguen entre los cordones de células transicionales y de células poco diferenciadas, pero muchos de ellos han reducido la luz del canal y en otros casos el conducto se ha reducido hasta obliterarse. Algunos canales lacunares se localizan en el estroma del ovario junto a los cordones de células intersticiales (fig 3).

Elementos nerviosos comienzan a ser evidentes, cercanos a esta delicada capa de fibroblastos que rodea a las células granulosa, disponiéndose entre los cordones de células transicionales y de células poco diferenciadas (fig 3). Es posible observar terminaciones nerviosas libres en el estroma ovárico, entre los capilares sanguíneos y en los cordones de células intersticiales.

La vascularización se hace más evidente entre los elementos de los cordones de transicionales y de células poco diferenciadas que han migrado hacia los folículos; aunque también es frecuente verlos entre el estroma ovárico (fig 3).

#### **Etapas de 21 días después del nacimiento.**

En este estadio del desarrollo, los cordones de células poco diferenciadas y los islotes de células transicionales se acercan cada vez más al folículo, de tal modo que se empieza a denotar la capa tecal interna (fig 4).

La ultraestructura de esta población de células poco diferenciadas persiste en este estadio del desarrollo, por lo que un aparato de Golgi bien representado, un RER abundante y mitocondrias con crestas transversales caracterizan a esta

población celular, además de que están siempre delimitados por una lámina basal (fig 4 y 5). La estructura de las células transicionales no se ha modificado de la mencionada en el ovario del pollo al nacimiento.

Los canales lacunares también quedan integrados a la teca interna de estos folículos, al igual que los vasos sanguíneos, muchos de los cuales se han formado recientemente (fig 5). Las terminaciones nerviosas también se ubican dentro de la teca interna, entre las poblaciones de células transicionales y poco diferenciadas.

#### **Etapas de 28 días después del nacimiento.**

La teca interna es evidente en esta etapa, se encuentra constituida por cordones de células poco diferenciadas, la población de células transicionales, canales lacunares que han disminuido su luz considerablemente, numerosos capilares, algunos en formación y abundantes terminaciones nerviosas que se insinúan entre las poblaciones ya mencionadas (fig 6).

Por fuera de la capa granulosa, formada por un epitelio cúbico, se localiza su membrana basal y a continuación podemos localizar, la capa de fibroblastos y colágena, que queda contigua a elementos del sistema vascular, los cuales se distinguen abundantemente en esta zona (fig 7). Cabe mencionar que las imágenes de microscopía electrónica, sugieren la formación de un gran número de capilares en la teca folicular (fig 7).

Las células poco diferenciadas localizadas en la teca interna, durante esta etapa, conservan su ultraestructura señalada anteriormente (fig 8). Los cordones de células transicionales se hacen más abundante y aparecen cercanos a la capa de fibroblastos que se localiza inmediatamente de la capa granulosa.

Es posible reconocer en esta región, cordones de células mixtas, donde se identifican en un mismo cordón las células poco diferenciadas y células transicionales, como se demuestra la

ultraestructura (fig 11). Las células transicionales tienen mitocondrias con crestas tubulares, ocasionalmente aparece el aparato de Golgi, el RER es escaso, aparecen cisternas de REL y los lípidos se incrementan en su citoplasma. A diferencia de la células poco diferenciadas donde su citoplasma tiene numerosos polirribosomas, abundante REP, no aparece o es escaso el REL, existe un aparato de Golgi bien desarrollado y existen mitocondrias con crestas transversales (fig 8 y 11).

A continuación de los elementos que forman la teca interna y en la región más periférica de los folículos, se van integrando componentes del tejido conectivo principalmente fibroblastos y fibras de colágena, junto con algunos canales lacunares, cordones de células poco diferenciadas y capilares (fig 6 y 9).

A partir de estos componentes, se va a ir constituyendo la teca externa y aunque en esta etapa es incipiente su desarrollo, ya es posible identificarla.

En la teca interna se reconocen, aunque en poca proporción la presencia de pequeños cordones de células esteroideogénicas, que provienen de la diferenciación de las células transicionales a células esteroideogénicas típicas (fig 6 y 9). Estas células se localizan entre la capa de fibroblastos adyacente a la capa granulosa y las poblaciones de la teca interna.

Es importante señalar, que las células esteroideogénicas típicas que dieron lugar a la población de células intersticiales, quedan ubicadas por fuera de los folículos (fig 6), al mismo tiempo que se les localiza entre el estroma del ovario durante la folliculogénesis.

En la teca interna, entre los cordones de células poco diferenciadas, se empiezan a definir numerosas terminaciones nerviosas libres, algunas de ellas establecen contacto, tanto con las células de los cordones de poco diferenciadas (fig 12), como con las células transicionales e incluso con las células

esteroidogénicas, que recientemente se transformaron, a partir de las células transicionales.

**Etapa de 36 días después del nacimiento.**

Durante la foliiculogénesis en el ovario del pollo de 36 días, se integran a la teca interna, las tres poblaciones esteroidogénicas que hemos venido mencionado desde la etapa del nacimiento, la población de células poco diferenciadas, las células de los conductos lacunares y las células esteroidogénicas típicas.

La población esteroidogénica madura se formó como resultado de la transformación de una población de células poco diferenciadas a células transicionales, las cuales a su vez dan lugar a las células esteroidogénicas típicas características de la teca interna.

La ultraestructura de estas células esteroidogénicas refleja la presencia de numerosas cisternas de REL, mitocondrias que contienen crestas tubulares y abundantes inclusiones lipídicas (fig 10).

Los canales lacunares se insinúan, sobre todo en la teca interna, aunque podemos reconocer algunos en la teca externa en formación, desde la etapa del ovario del pollo de 28 días (fig 6). Estos lacunares reducen su luz, de tal manera que persisten en etapas posteriores, aparentemente como cordones de células poco diferenciadas, teniendo en cuenta que presentan el mismo arreglo subcelular .

Por último, durante esta etapa se hacen más evidentes, la vascularización y la inervación, tanto en la teca interna como en la teca externa de estos folículos, de tal manera que en esta etapa, se encuentran totalmente constituidos.

## **POBLACIONES DE CELULAS ESTEROIDOGENICAS EN EL OVARIO DE LA GALLINA ADULTA.**

Al analizar, la estructura del folículo preovulatorio en el ovario de la gallina, encontramos además de las células granulosas, dos poblaciones celulares: Una población de células esteroideogénicas típicas, que se encuentran como parte de la teca interna, las cuales se originaron a partir de la transformación paulatina de células poco diferenciadas de la teca.

La otra población que forma parte del folículo ovárico, es la representada por cordones de células poco diferenciadas que se integraron a la teca externa del folículo, desde la medula ovárica en las primeras edades postnatales. Estas poblaciones siempre se les encuentra formando cordones de dos a más células, rodeadas por una lamina basal bien delimitada. En su citoplasma se localiza un abundante retículo endoplásmico rugoso (RER), numerosos polirribosomas, un aparato de Golgi bien organizado y mitocondrias con crestas transversales.

El sistema lacunar también queda integrado dentro del folículo ovárico, a nivel de la teca externa donde permanecen como canales lacunares en los folículos preovulatorios más inmaduros, posteriormente se obliteran y algunos de ellos degeneran, de tal forma que en los folículos preovulatorios próximos a ovular desaparecen. La estructura fina de estas poblaciones celulares que integran los canales lacunares es muy similar a la descrita para las células poco diferenciadas, debido a que ambas tienen un origen epitelial común. Las células que rodean al conducto lacunar presentan hacia la luz uniones intercelulares estrechas; el citoplasma contiene abundante RER, mitocondrias con crestas transversales, el aparato de Golgi está presente cercano al núcleo de forma ovoide.

Otro componente importante que se integra a todo lo largo de la capa tecal es el tejido nervioso, representado por numerosas

terminaciones libres localizadas sobre todo en la teca interna, entre la capa fina de fibroblastos localizada a continuación de la membrana basal que delimita a la capa granulosa y las células esteroidogénicas de la teca interna.

Dentro del ovario de la gallina adulta se localizan cordones de células esteroidogénicas típicas que corresponden a las células intersticiales del ovario, estas células esteroidogénicas se localizan cerca de la región del ovario, donde se encuentran los folículos en diferentes etapas de maduración. Estos acúmulos de células intersticiales derivan de los cordones medulares de células esteroidogénicas típicas y son distintas de las esteroidogénicas de la teca interna que se originan a partir de las células poco diferenciadas ubicadas en la misma.

Los folículos más inmaduros se han clasificado en folículos de la línea blanca y su tamaño varía de 2 a 5 mm. Los folículos preovulatorios correspondientes a la línea amarilla, se han clasificado en orden creciente al diámetro folicular en: F6, F5, F4, F3, F2 y F1. El grosor de la capa tecal interna entre los folículos F6 y F1 se modifica, de tal manera, que se aprecia un adelgazamiento gradual conforme el folículo madura.

Las células esteroidogénicas de la teca interna disminuyen su volumen de tal manera que en los folículos preovulatorios F1, próximos a ovular, son escasas o están ausentes. Las células poco diferenciadas de la teca externa se encuentran localizadas hacia la periferia, y también disminuyen a la par que el folículo se diferencia. La teca externa constituye la mayor parte del grosor de la pared folicular, se encuentra formada por tejido conectivo, el cual forma una capa fibrosa a todo lo largo de la teca externa.

La estructura del folículo F6 y F5 es muy parecida, se distingue en contacto estrecho con el ovocito una capa de células granulosas, rodeada por una membrana basal, a continuación se observa una capa delgada de fibroblastos, que marca el inicio de

la teca. En la teca interna, del folículo preovulatorio más pequeño, F6 se encuentran numerosos islotes de células esteroideogénicas a todo lo largo del diámetro folicular, los cuales están delimitados por una lámina basal, en ocasiones discontinua, pero en esas zonas libres se insinúa una proyección de los fibroblastos adyacentes (fig 13 y 14). Estas células de la población esteroideogénica conservan la ultraestructura descrita anteriormente, pero sobre todo es evidente el contenido de inclusiones lipídicas (fig 14), mitocondrias con crestas tubulares y vesículas de REL (fig 16). Por encima de esta población esteroideogénica madura se encuentran numerosos vasos sanguíneos, algunos de ellos en formación y entre ellas es posible localizar un buen número de terminaciones nerviosas libres (fig 13 y 14). Al iniciar la teca externa, en contacto con la teca interna, se distingue se distingue una mayor cantidad de tejido conectivo. La teca externa, que es el componente mayoritario del folículo, está constituida por tejido conectivo fibroso, en su mayoría formado por fibroblastos y colágena (fig 13 y 15), entre ellos se distinguen células aparentemente mioepiteliales. Entre los fibroblastos de la teca externa, ocasionalmente, se localizan algunos cordones de células poco diferenciadas, pero donde se localizan abundantemente es hacia la porción externa, a todo lo largo del folículo (fig 13 y 15).

La ultraestructura de estas células poco diferenciadas se demuestra con la presencia de abundante RER, numerosos polirribosomas dispersos en su citoplasma y mitocondrias con crestas transversales. Entre estas células se observan desmosomas que las unen entre sí y se encuentran rodeadas por una lámina basal (fig 17).

En folículo F4 se observa la capa granulosa constituida por un epitelio pseudoestratificado (fig 18) (fig 2, p 9 del 3er artículo anexo).

Respecto a la teca interna, las células esteroidogénicas (fig 2, p 9 del 3er artículo anexo) siguen presentando características ultraestructurales similares a lo mencionado en el F6 como son, un citoplasma con abundantes inclusiones lipídicas, un RER bien definido, y mitocondrias con crestas transversales (fig 18) (fig 3A, p 10 del 3er artículo anexo).

Cabe hacer notar que las células esteroidogénicas comienza a reducirse en su número a partir del folículo F4 y F3, esta comparación se hace en ambos folículos debido a que su estructura es muy parecida; además de que es notable en ambos folículos el incremento de la vascularización entre las células esteroidogénicas maduras (fig 18). Las terminaciones nerviosas, persisten entre las células esteroidogénicas de la teca interna (fig 18) (fig 2, p 9 del 3er artículo anexo).

En la teca externa del folículo preovulatorio F4, continúa la misma organización del tejido conectivo fibroso, en comparación con los folículos más inmaduros, pero lo que es evidente en esta etapa es la presencia de capilares entre los fibroblastos y las fibras de colágeno en la zona contigua a los cordones de células poco diferenciadas.

Estos cordones de células poco diferenciadas se pueden localizar entre la capa de fibroblastos o en la porción más periférica de la teca externa. La organización subcelular de esta población de células poco diferenciadas es similar a la descrita (fig 3B, p 10 del 3er artículo anexo); es evidente el RER, las mitocondrias con crestas transversales, polirribosomas y lípidos, aunque la presencia de estos es muy variable y en algunas células están ausentes (fig 3B, p 10 del 3er artículo anexo).

En este folículo F4 y sobre todo en el F3, esta población de células poco diferenciadas comienza a disminuir.

En el último folículo F1 y el F2 los cambios y la estructura no se modifica mayormente por lo cual describimos las

características del folículo F1. La capa de granulosa de este folículo preovulatorio se modifica substancialmente, las células se separan indicando que está próxima la ovulación, ya que le faltan sólo 24 horas para ser ovulada. En este folículo preovulatorio se presenta una franca disminución de la población esteroidogénica en la teca interna, por efecto de una atrofia y degeneración celular que se llevan a cabo; a pesar de ello el componente vascular es muy abundante y parece estar aumentado (fig 19). Las terminaciones nerviosas aún se distinguen entre las células esteroidogénicas.

En el F1 la teca externa se hace más fibrosa por la invasión de tejido conectivo compacto.

La ultraestructura de las células esteroidogénicas, aunque sigue siendo la misma, presenta signos de degeneración en su citoplasma así como pycnosis nuclear; siendo muy evidente el desaparregio de organelos sobre todo de mitocondrias.

La población de células poco diferenciadas en los folículos F2 y F1 disminuye de tal modo, que en el folículo más avanzado F1, desaparecen totalmente y su localización en la teca externa es ocasional (fig 19).

El análisis de la secreción de 17 $\beta$ -estradiol y testosterona obtenida del medio de incubación donde se colocó la suspensión celular tecal aislada por gradiente de densidad, se muestra en la fig 1, p 8 del 3er artículo anexo. De igual forma se demostró que en los folículos preovulatorios más pequeños, F5 y F4, se observó una mayor secreción hormonal, en comparación con el folículo F3, donde estos valores son menores.

El patrón de distribución del gradiente de densidad de las células secretoras de testosterona, mostró un valor máximo entre 1.037 y 1.048 gr/ml en los tres folículos estudiados.

Asimismo, la población celular colectada en la fracción comprendida entre los 1.059 y 1.070 gr/ml, en el gradiente de

densidad, presentó una mayor secreción de  $17\beta$ -estradiol. La diferencia del patrón de distribución de la poblaciones secretoras de testosterona y  $17\beta$ -estradiol se observaron en los tres tipos de folículos analizados.

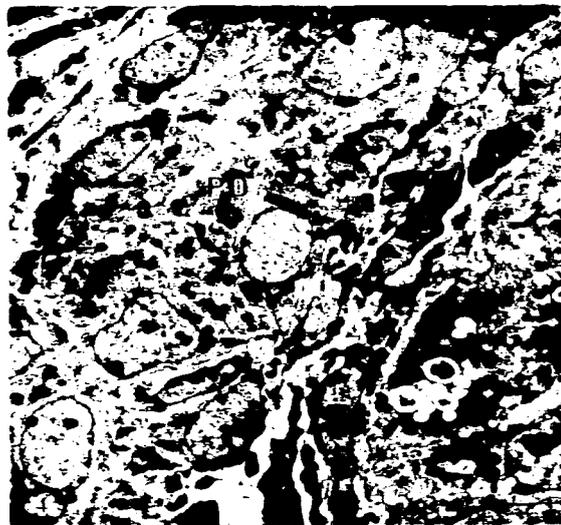
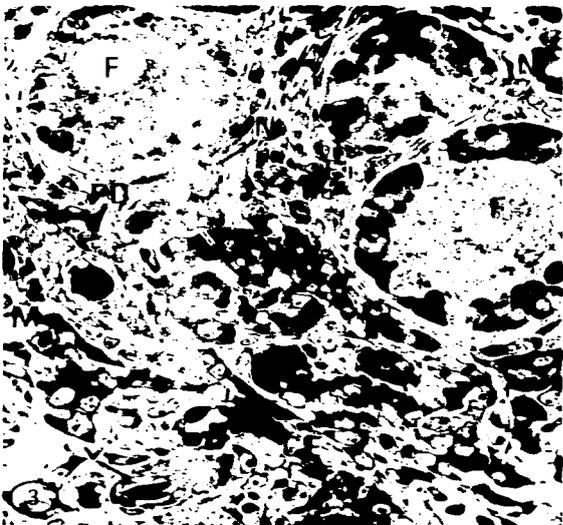
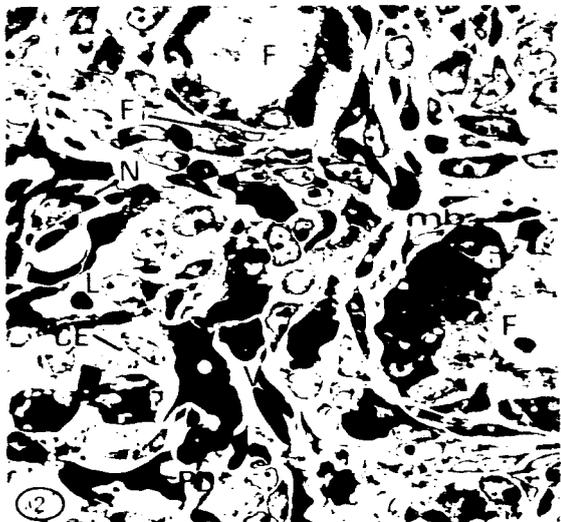
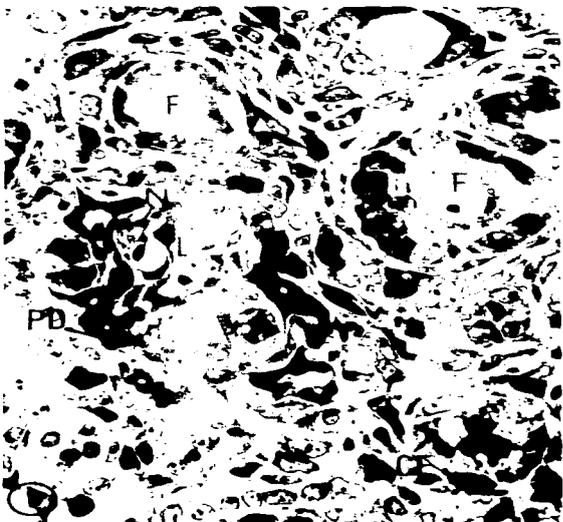
**IMAGENES QUE MUESTRAN LA PARTICIPACION DE LAS  
POBLACIONES  
CELULARES ESTEROIDOGENICAS EN EL OVARIO DEL POLLO, EN  
DIFERENTES  
ESTADIOS DEL DESARROLLO POSTNATAL:**

**FIG. 1** Corte transversal del ovario de pollo a los 7 días posteclosión, en la corteza se localizan folículos (F) en maduración, alrededor de los cuales se están integrando células del tejido conectivo, terminaciones nerviosas libres (N) localizadas entre el estroma ovarico, cordones de células esteroideogénicas (CE) y acumulos de células poco diferenciadas (Pd). X 570.

**FIG. 2** Micrografía tomada con microscopia de luz que muestra con mayor detalle a los 7 días, hacia la porción cortical del ovario, la relación entre las poblaciones esteroideogénica (CE) y poco diferenciada (PC) con los folículos (F), para formar la capa teal; se observan algunos vasos sanguíneos (v) y lacunares (L) entre ellos. X 1,200.

**FIG. 3** Panorámica del ovario a los 15 días de nacido, se distinguen algunos folículos constituidos por el ovocito, la capa de células granulosas (G), delimitada por una delgada capa de tejido conectivo con fibroblastos (F) que la rodean. Por fuera del folículo se encuentran cordones de células epiteliales poco diferenciadas (PD), canales lacunares (l) y esteroideogénicas (CE). Hacia la médula cvárica (Me) se distinguen también estas poblaciones celulares. X 900 .

**FIG. 4** Electromicrografía de un folículo ovárico a los 21 días posteclosión, contigua a la capa granulosa (G) se localiza la teca en formación, donde se observan acumulos de células poco diferenciadas (PD), delimitadas por una lámina basal bien delimitada; X 4,600.



**FIG. 5** Detalle de un folículo en desarrollo a los 21 días postnatales, donde se observan con microscopía electrónica, las células granulosa (G) y cerca de ellas numerosos fibroblastos (F) y algunas terminaciones nerviosas (N); ambas poblaciones: esteroidogénicas (CE) y poco diferenciadas (PD) se ubican inmediatamente después en el folículo, además de que algunos de los canales lacunares quedan incluidos dentro de la teca (10. X 4,400.

**FIG. 6** Observación con microscopía de luz de un folículo antral localizado en el ovario de 28 días; se identifica la teca separada de la capa granulosa pseudoestratificada (G), por la membrana basal que queda en contacto directo con la capa de fibroblastos (Fi). La teca está formada por acúmulos de células poco diferenciadas (PD), canales lacunares que han reducido su luz (Lc), numerosos capilares (v), terminaciones nerviosas (N); los cordones de células esteroidogénicas típicas quedan en la periferia del folículo cerca del estroma ovarico. X 1,440.

**FIG. 7** Electromicrografía que ilustra parte de la capa tecal de un folículo en desarrollo, se visualiza un acúmulo de células poco diferenciadas (PD) con inclusiones lipídicas; una terminación nerviosa libre (N) y numerosos capilares en formación, fibroblastos (Fi) y fibras de colágena. X 14,400.

**FIG. 8** A mayor aumento, con microscopía electrónica se distinguen, dentro de la teca de un folículo antral, cordones de células transicionales (CT), los cuales están delimitados por una lámina basal, el retículo endoplásmico rugoso está aun presente (RER), además de un evidente aparato de Golgi (GO), numerosas inclusiones lipídicas (L). Las mitocondrias presentan crestas tubulares (M), aunque también se observan algunas mitocondrias con crestas transversales (M\*). Las células están interconectadas por desmosomas (D) y en su citoplasma se observan cilios (Ci), como evidencia de su origen epitelial. X 10,400 .

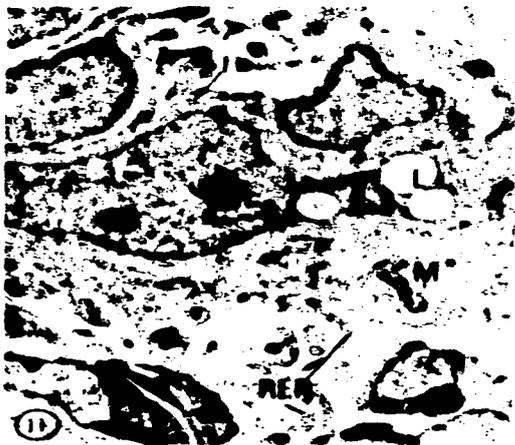
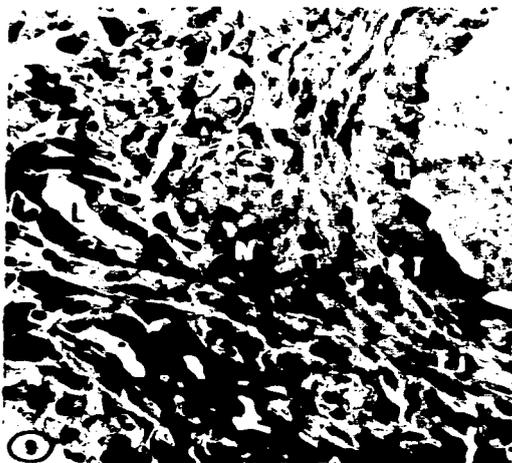


**FIG. 9** Panorámica de la corteza del ovario de pollita a los 28 días de nacida, se identifica un folículo donde se aprecian las células granulosas constituyendo un epitelio cúbico (G) y en seguida la capa delgada de fibroblastos (F) se localizan las poblaciones celulares de poco diferenciadas (PD) y células transicionales (CT). Entre ellas se distinguen numerosos vasos sanguíneos (V) y canales lacunares (LC), terminaciones nerviosas libres (N). En la periferia de la teca y entre los folículos, se localiza la población de células esteroidogénicas (CE). X 1,440.

**FIG.10** A mayor amplificación se observan células esteroidogénicas obtenidas de un folículo ovárico de pollita los 36 días de posteclosión. Con características típicas de productoras de esteroides: abundante retículo endoplásmico liso (REL), mitocondrias con crestas tubulares (M) y numerosas inclusiones lipídicas (Li). X 11,200.

**FIG.11** Con mayor detalle, en un folículo ovárico de 28 días, se identifica un acúmulo de células transicionales (CT), se distinguen uniones desmosómicas (D) entre ellas y en su citoplasma se localizan: aparato de Golgi (Go), inclusiones lipídicas (L), mitocondrias (M) y retículo endoplásmico rugoso (RER). X 11,000.

**FIG.12** Electromicrografía donde se identifica a un mayor aumento, la presencia de una terminación nerviosa libre (N), en contacto con un acúmulo de células poco diferenciadas (PD), en la teca vascularizada del folículo (G). X 10,400.



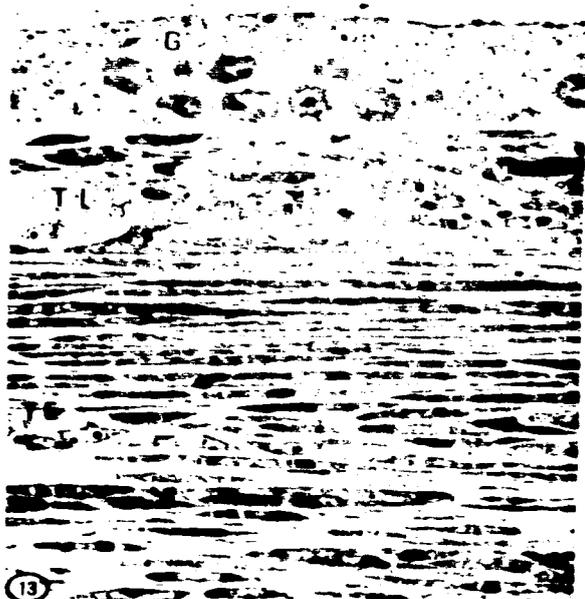
**MICROGRAFIAS QUE ILUSTRAN LA INTEGRACION DE LAS  
POBLACIONES  
ESTEROIDOGENICAS EN EL OVARIO DE LA GALLINA ADULTA A  
TRAVER DE LA  
MADURACION FOLICULAR.**

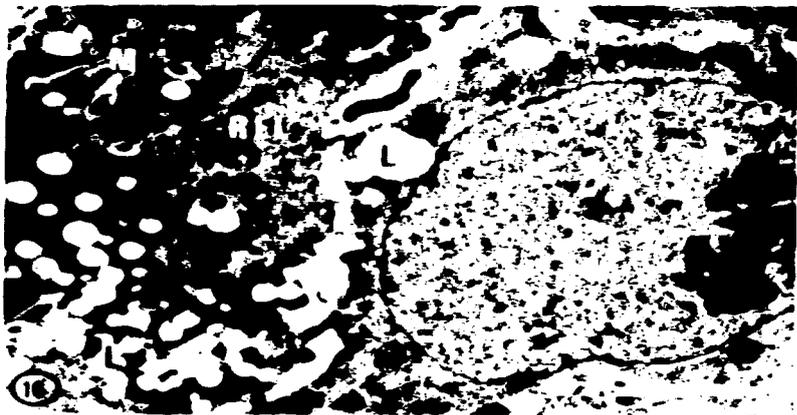
**FIG.13** Corte transversal de la pared del folículo preovulatorio F6, obtenido de la gallina adulta, donde se distingue el epitelio cúbico de la capa granulosa (G), rodeada por una membrana basal; en seguida se encuentra la capa tecal interna (TI), con abundantes vasos sanguíneos (v), en ella se reconoce una capa de células esteroideogénicas (CE) con inclusiones lipídicas a todo lo largo del folículo. La teca externa fibrosa (TE) formada por células alargadas donde se localizan acúmulos celulares poco diferenciadas (PD). X 1,000.

**FIG.14** Imágen que muestra con mayor aumento un segmento del folículo F6, donde se reconoce la población de células esteroideogénicas con abundantes inclusiones lipídicas, así como capilares sanguíneos (v) y terminaciones nerviosas (N). A continuación se encuentra la capa tecal externa constituida por fibroblastos (F1). X 1,800.

**FIG.15** Detalle del folículo F6 a nivel de la teca externa (TE), donde se observan los acúmulos de células poco diferenciadas (PD), delimitadas por una lámina basal (lb). X 920.

**FIG.16** Micrografía electrónica de la población de células esteroideogénicas (CE), localizadas en la teca interna (TI) del folículo preovulatorio F6. En su citoplasma se encuentran abundantes lípidos (L), retículo endoplásmico liso (REL) y mitocondrias con crestas tubulares (M). X 13,600.



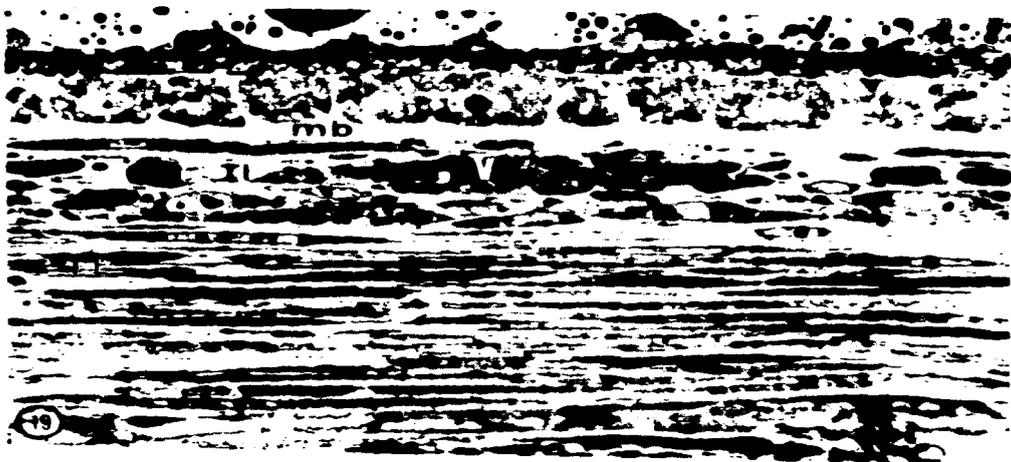


**FIG.17** Amplificación de un cordón epitelial de células poco diferenciadas (PD) delimitadas por la lámina basal (lb), estas células están interconectadas por desmosomas (D), en su citoplasma se localizan abundantes lípidos (L), y polirribosomas, así como mitocondrias con crestas transversales (M). En continuidad con esta población se observan numerosos fibroblastos de la teca externa. X 27,200.

**FIG.18** Imágen tomada con microscopia de luz de un corte transversal del folículo preovulatorio F4, en la teca interna, muy vascularizada (v), se ubica la población esteroidogénica (CE) y en la teca externa fibrosa (TE) se reconoce la población de células poco diferenciadas. X 360.

**FIG.19** Observación del folículo preovulatorio próximo a ovular, F 1, la población esteroidogénica de la teca interna (TI) involucrena durante esta etapa; la población de células poco diferenciadas de la teca externa fibrosa (TE) está ausente, según se ilustra en la figura. X 1,200.





## DISCUSION

El principal componente de la médula del ovario izquierdo, es el compartimiento epitelial, en esta porción se localiza la población de células esteroideogénicas (Blanchette, 1966).

Las células de los cordones medulares ováricos, presentan características ultraestructurales y enzimáticas de células esteroideogénicas (Narbaitz y Adler, 1966, Jordanov et al, 1978 y Scheib y Haffen, 1969).

Nuestros estudios confirman estos hallazgos porque, encontramos células esteroideogénicas típicas en los cordones medulares del ovario del pollo recién nacido. Sin embargo, dentro de los cordones medulares encontramos una subpoblación muy importante de células poco diferenciadas, que representan la persistencia de los cordones epiteliales primarios. A esta última población celular no se le ha atribuido ninguna función en especial, pero las observaciones con microscopía electrónica sugieren que podrían ser las células que originan a las células esteroideogénicas típicas, ya que se observan imágenes de transición entre ambos tipos celulares.

Por otro lado, se ha estudiado que algunos de los cordones epiteliales de la médula ovárica se vacuolizan, dando como resultado la formación del sistema de conductos lacunares (Narbaitz y Adler, 1966 y Stahl y Carion, 1973), por lo que estos lacunares, reconocidos en nuestro material, están rodeados por células poco diferenciadas.

La administración de la hCG en el pollo durante la etapa embrionaria, provoca un estímulo del ovario, medido como un aumento de la secreción de andrógenos y estrógenos (Teng y Teng, 1977a y b y 1979, Teng et al, 1982, Cedard, et al, 1968 y Woods et al, 1981).

Nuestras observaciones en el ovario del pollo recién nacido

después del tratamiento hormonal con hCG, ponen de manifiesto cambios morfológicos en la médula ovárica. El hecho de que las células de los cordones esteroidogénicos aumenten su volumen citoplásmico, el volumen mitocondrial, los lípidos y el REL, demuestra que esta población celular es efectora de la hCG. Las modificaciones que se produjeron en las células poco diferenciadas, así como en las células que constituyen los canales lacunares, como son el incremento del RER y el volumen mitocondrial, ponen de manifiesto que ambas poblaciones son también efectoras al estímulo de la hCG. Respecto al sistema lacunar, es difícil discutir su respuesta ante el efecto hCG, ya que el papel que juega dentro del ovario, no está aún aclarado (Callebaut, 1979).

Lo más importante de estas tres poblaciones celulares es que, se originan a partir cordones epiteliales de la médula del ovario y que todas responden ante el estímulo de la hCG.

Cabe mencionar que en el caso de las células prefoliculares, que son las células somáticas que envuelven a los ovocitos en la corteza del ovario, no hubo respuesta a la gonadotropina coriónica. En cambio, la vascularización del ovario se incrementó notablemente como respuesta a la hCG, probablemente debido a una reacción asociada a la propia estimulación de la glándula.

Es importante hacer notar que la transformación de las células poco diferenciadas a células esteroidogénicas maduras, explica el incremento en volumen de la población de células intersticiales, producido como respuesta al tratamiento con hCG. Estudios previos llevados a cabo sobre el efecto de la LH y FSH en cultivo organotípico del ovario de embiones de pollo de 10 días de incubación (Grassi-Milano y Pitini, 1979), no muestran cambios en los cordones medulares después de la administración de gonadotropinas, esto se puede explicar por las diferentes

condiciones experimentales, en que esos estudios se llevaron a cabo.

La evolución de las células germinales localizadas en la médula ovárica ha sido poco estudiada previamente. Los experimentos realizados demuestran que las germinales se reducen en el estroma ovárico de la médula, cuando se administra la hCG, por lo que la migración y/o la remoción, parece estar influenciada por la presencia de gonadotropinas. Se ha descrito que el incremento de los esteroides ocasionado por la estimulación de la hCG, causa una reducción en el número de células germinales de la médula ovárica (Teng y Teng, 1977).

De acuerdo a los resultados obtenidos, la dosis única de hCG administrada a los 17 días de vida embrionaria, produjo el mismo efecto que las dosis aplicadas a los 13, 15 y 17 días, por lo que se deduce que la etapa más importante para inducir el efecto de hCG en el ovario, se presenta en los últimos cuatro días de desarrollo embrionario.

A pesar de que existe una abundante información sobre el desarrollo del ovario de las aves, no existen datos claros sobre las etapas subsecuentes al nacimiento.

Los cambios más importantes en el ovario de las pollitas después de la eclosión, son la invasión de la médula por los folículos primarios. Los cordones de células poco diferenciadas se colocan en proximidad de los folículos en desarrollo. Por otra parte, los componentes del sistema lacunar, junto con vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas, también quedan en contacto con los folículos. Por fuera de estos componentes, se localizan las células esteroidogénicas típicas, de tal modo que quedan como islotes en el estroma ovárico.

En las edades más avanzadas, entre 28 y 36 días después de la eclosión, a partir de los cordones poco diferenciadas se forman células transicionales y una población de células esteroidogénicas

típicas, que se ubican a continuación de la capa granulosa y constituyen la teca en formación. Cerca de estos cordones migran los componentes vasculares, que en esta etapa presentan un gran desarrollo, delimitando así la teca vascular. De igual manera, se observa un evidente desarrollo del tejido conectivo, que se organiza a continuación de la capa de células esteroidogénicas, para formar el tejido fibroso de la teca externa. Cordones de células poco diferenciadas, lo mismo que algunos de los canales lacunares quedan periféricamente, entre la capa externa.

Con respecto a las células intersticiales del ovario, aunque se han llevado a cabo estudios para determinar la incorporación de las células intersticiales de la médula del ovario a la capa tecal de folículos ováricos (Narbatz y De Robertis, 1968), no se cuenta con una información clara sobre el destino de estas células. En otros estudios (Dahl, 1970) se propone que las células intersticiales de la médula avanzan sobre la capa granulosa del folículo y se disponen en la teca interna, pero no indican en que tipo de folículo se realizó dicho estudio. Lo que si se ha demostrado con certeza es que estas células intersticiales responden al efecto de la LH en los animales adultos (Huang y Nalvandov, 1979).

De acuerdo a otros estudios realizados en la teca externa follicular, se ha referido la presencia de nidos de células intersticiales llamadas luteas (Fell, 1925) o "glándula tecal" (Dahl, 1970a). Esta glándula tecal se han estudiado desde un punto de vista ultraestructural y se ha observado que está formada por acúmulos de células epiteliales que se localizan a todo lo largo del diámetro follicular, además de que se ha visto que los acúmulos presentan terminaciones nerviosas libres (Dahl, 1970a y b y Dahl, 1971). Se ha referido que las células que conforman estos acúmulos son de dos tipos: las células productoras de esteroides, que contienen numerosas inclusiones lipídicas, mitocondrias con

crestas tubulares y células envolventes que rodean a las primeras y cuya morfología es totalmente diferente, son células alargadas planas, que se encuentran alrededor del cordón de esta glándula tecal; además de están interconectadas con desmosomas, no contienen lípidos y en su citoplasma es evidente el RER (Dahl, 1970).

De acuerdo a las observaciones descritas en esta tesis, los nidos de células intersticiales tal como los describe Dahl (1970a y b y 1971), se distinguen en la periferia de los folículos y no formando parte de la teca. Por lo que es incorrecta la denominación de "glándula tecal". Esta observación es definitiva en los folículos preovulatorios, en los que la teca externa está bien definida, en estos casos las células intersticiales del ovario quedan en el estroma ovárico, por fuera de la teca externa. No deben confundirse, las células esteroidogénicas típicas de la teca interna, con los islotes de células intersticiales, aunque ambas tengan una estructura similar y puedan tener analogías funcionales, deben considerarse como poblaciones de células distintas. La principal diferencia es que las células esteroidogénicas de la teca interna sufren cambios durante el desarrollo del folículo preovulatorio, mientras que los islotes de células intersticiales permanecen entre los folículos con una aparente independencia de la maduración folicular.

En la teca externa de los folículos analizados ultraestructuralmente, se encuentran acúmulos de células poco diferenciadas rodeadas por una lámina basal que las delimita. Su citoplasma presenta numerosos polirribosomas, un abundante RER y mitocondrias con crestas transversales. En la literatura no se había descrito la presencia de esta células. Sin embargo se han encontrado células aromatasa positivas dentro de la teca externa (Nitta, et al, 1991). Estos autores consideran que son fibroblastos especializados, pero lo más probable es que las

células aromataasa positivas sean las células poco diferenciadas, lo que coincidiría con nuestros resultados, que proponen que la población poco diferenciada de la teca externa es la que produce los estrógenos tecales (ver el 3er trabajo del anexo).

Respecto a la organización de la teca, cabe mencionar que la misma se modifica al avanzar la maduración folicular. En los folículos pequeños de aproximadamente 1mm de diámetro no se han organizado aún las dos regiones de la teca, a diferencia de los folículos de 2mm, en los cuales ya es posible su identificación. En los folículos inmaduros de la gallina adulta, estudiados en este trabajo, dentro de la teca interna, inmediatamente después de la capa de fibroblastos que separa la capa granulosa de la teca, se diferencia una población de células esteroidogénicas, caracterizadas ultraestructuralmente como secretoras de esteroides, cabe mencionar que nuestras observaciones coinciden con datos previos reportados por otros autores (Wells y Gilbert, 1984). Esta población esteroidogénica se origina, según nuestras observaciones, por una transformación temprana de cordones medulares de células poco diferenciadas a células transicionales que comparten temporalmente las características ultraestructurales de ambas poblaciones celulares y que al avanzar la foliculogénesis, y muy probablemente mediante un estímulo LH, propician su diferenciación a células esteroidogénicas típicas.

Respecto a nuestras observaciones con microscopía de luz y electrónica, de los cambios estructurales que llevan a cabo en la teca de los folículos de la línea amarilla o preovulatorios del F6 al F1. La teca interna mostró un adelgazamiento gradual, las células esteroidogénicas típicas, con inclusiones lipídicas, ubicadas en la teca interna, se mantienen sin modificación del folículo F6 al F3, pero en los folículos F2 y F1 sufren una degeneración gradual. A diferencia de la vascularización, que aunque en todos los folículos es evidente, en los folículos

próximos a ovular, como es el F1, se incrementa de manera sustancial.

Uno de los cambios más evidentes que ocurre en la teca externa es que los islotes de poco diferenciadas se reducen y adquieren una forma más alargada, de tal manera que en el folículo próximo a ovular F1, desaparecen casi por completo; asimismo la teca externa disminuye de espesor.

Estos cambios morfológicos pueden relacionarse con las modificaciones en la actividad esteroidogénica de la teca de los folículos preovulatorios. Se conocen los cambios en la secreción de  $17\beta$ -estradiol, ya que únicamente los folículos más inmaduros del F6 al F3, tienen una producción cuantificable de estrógenos. En relación a la secreción de testosterona, se observó un fenómeno similar, con la mayor producción en el folículo F6, mientras que en el folículo más grande F1, no se detectó producción hormonal.

Las diferencias de densidad entre las poblaciones que secretan testosterona y las poblaciones que producen  $17\beta$ -estradiol, se pueden correlacionar con los datos ultraestructurales. Las células productoras de andrógenos son las células de baja densidad y corresponden a las células de la teca interna que poseen abundantes inclusiones citoplásmicas de lípidos. Mientras que las células que segregan  $17\beta$ -estradiol, son de mayor densidad y podrían corresponder a las células poco diferenciadas que se encuentran en la teca externa y que no poseen inclusiones lipídicas en su citoplasma. Estos hallazgos concuerdan con lo que se ha descrito en reportes previos, sobre la secreción de testosterona en la teca interna y la producción de  $17\beta$ -estradiol en la teca externa de los folículos preovulatorios del ovario de las aves. (Porter, et al, 1989 y Pedernera, et al, 1989).

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados hasta ahora obtenidos en este trabajo se puede concluir :

1. Existe un componente epitelial en la médula ovárica del pollo al nacimiento, que está constituido por tres poblaciones celulares, las células esteroidogénicas típicas, la población de células poco diferenciadas y las células que forman a los canales lacunares.

2. Los cambios más relevantes originados, ante la estimulación de hCG son, el incremento en el volúmen de los cordones de células esteroidogénicas la transformación de células poco diferenciadas en células esteroidogénicas maduras, el mayor desarrollo de los sistemas vascular y lacunar de la médula ovárica y por último, una disminución de células germinales ubicadas en el estroma de la médula del ovario del pollo recién nacido.

3. Las tres subpoblaciones epiteliales, en la médula ovárica al nacimiento, se integran a la capa tecal de los folículos ováricos.

4. Las células poco diferenciadas, migran hacia los folículos en desarrollo y originan la capa de células esteroidogénicas típicas, que se localizan en la teca inmediatamente después de la capa fina de fibroastos que rodean a la capa granulosa.

5. Los cordones medulares formados por células esteroidogénicas maduras, se localizan por fuera de la pared folicular y permanecen ahí, se les denomina células intersticiales del ovario . En etapas más avanzadas de la foliculogénesis se les localiza en el estroma ovárico y en la periferia de los folículos, tanto inmaduros como preovulatorios.

6. Los canales lacunares medulares se integran a la teca externa en formación y se localizan en la teca externa folicular

7. Existe una activa proliferación de capilares sanguíneos en la teca interna cuando se está formando, sobre todo cerca de la población esteroidogénica, que marcan el inicio de la evidente

vascularización de la teca interna.

8. Grupos de estos cordones epiteliales poco diferenciadas, a medida que avanza el desarrollo folicular se ubican entre la teca externa.

9. Dos poblaciones productoras de esteroides, se identificaron y caracterizaron estructuralmente, en los folículos preovulatorios del F6 al F1 en la gallina adulta. Estas dos poblaciones esteroidogénicas son: la población formada por células esteroidogénicas típicas localizadas en la teca interna y la otra población representada por cordones de células poco diferenciadas, ubicadas entre la teca externa.

10. La población de células esteroidogénica típicas participa en la secreción de andrógenos, ésta población es abundante en los folículos preovulatorios del F6 al F3, pero en los folículos mayores F2 y F1, comienzan a reducirse y a degenerar. La población de células poco diferenciadas intervienen en la síntesis de estrógenos, principalmente el 17 $\beta$ -estradiol; éstos cordones son abundantes en los folículos preovulatorios del F6 al F4, disminuyen paulatinamente, a partir del folículo F3 y en el folículo próximo a ovular F1, ya no se encuentran.

11. Finalmente se propone que existen en el ovario dos poblaciones celulares con capacidad esteroidogénica, que se originaron desde la etapa temprana en el pollo y posteriormente se integran al componente tecal del folículo maduro en la gallina.

## BIBLIOGRAFIA

- Adashi, E.Y. y Hsueh, A.J.W. (1982). Estrogens augment the stimulation of ovarian aromatase activity by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *J Biol Chem* 257:6077.
- Amsterdam A., Koch, Y., Lieberman, M. E., y Lindner, H. R. (1975). Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *J Cell Biol.*, 67: 894-900
- Andersen, A. C. y Simpson, M.E. (1973). The Ovary and Reproductive Cycle of the Dog (Beagle). Geron-X, los Altos, California.
- Armstrong, D. T. y Dorrington, J. H. (1977). Estrogen biosynthesis in the ovaries and testes. In: *Regulatory Mechanisms affecting gonadal hormone action*, edited by J. A. Thomas and R. H. Singhal pp 215-258. University Park Press Baltimore.
- Armstrong, D. T. y Papkoff, H. (1976). Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rats *in vivo* by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 99: 1144-1151.
- Armstrong, D.G. (1984). Ovarian aromatase activity in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J Endocr* 100:81-86.
- Baird, D. T. (1977). Evidence *in vivo* for the two-cell hypothesis of oestrogen synthesis by the sheep graafian follicle. *J Reprod Fertil* 50: 183-185.
- Baker, T.G. (1963). A quantitative and cytological study of oogenesis in the rhesus monkey. *J Anat* 100: 761-776.
- Benoit, J. (1950). *Organes Uro-Genitaux*. In "Traite de Zoologie" (Edited by P. P. Grassé) Vol 15 Oiseaux pp 341-377. Paris, Masson.
- Bjersing, L. y Carstensen, H (1964). The role of the granulosa cell in the biosynthesis of ovarian steroid hormones. *Biochim Biophys Acta* 86: 639-640.
- Bjersing, L. y Carstensen, H. (1967). Biosynthesis of steroids by granulosa cells of the porcine ovary *in vitro*. *J Reprod Fertil* 14: 101-111.
- Bjersing, L. (1978). Maturation, morphology and endocrine function of the follicular wall in mammals. In: *The Vertebrate Ovary. Comparative Biology and Evolution* by R. E. Jones pp 181-241 Pleum, New York.
- Blanchette, E. J. (1966). Ovarian steroid cells. I. Differentiation of the lutein cell from the granulosa follicle cell during the preovulatory stage and under the influence of exogenous gonadotrophins. *J Cell Biol* 31: 501-516.
- Bogovich, K. y Richards, J. S. (1982). Androgen biosynthesis in developing ovarian follicles: evidence that lutenizing hormone regulates thecal 17 $\alpha$ -hydroxylase and C17-20-lyase activities. *Endocrinology* 111: 1201-1208.

- Bookhout, C. G. (1945). The development of the guinea pig ovary from sexual differentiation to maturity. *J Morphol* 77:233-263.
- Boucek, R. J. y Savard, K. (1970). Steroid formation by the avian ovary *in vitro* (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocr* 15: 6-11.
- Bouin, P. (1902). Les deux glandes a secretion interne d l'ovaire; la glande interstitielle et le corps jaune. *Rev Med de L'Est* 34: 465-472.
- Brambell, F. W. R. (1927). The development and morphology of the gonads of the mouse. I. the morphogenesis of the indifferent gonad and of the ovary. *Proc R Soc London Ser B* 101: 391-408.
- Brambell, F. W. R. (1956). Ovarian changes in: *Marshall's Physiology of Reproduction* (A. S. Parkes, ed.) pp 397-542 Longmans, Green, London.
- Brodie, A.M.H. (1983). The ovary. In G.B. Sevia (ed.) *Comprehensive Endocrinology*, Raven Press, New York. PP 1-17
- Byakov A. G. y Lintern-Moore, S. (1973). Follicle formation in the immature mouse ovarii: The role of the rete ovarii. *J Anat* 116: 207-217.
- Byakov, A. G. (1974). Does the rete ovarii act as a trigger for the onset of meiosis? *Nature* (London) 252: 396-397.
- Byakov, A. G. (1975). The role of the rete ovarii in meiosis and follicle formation in the cat, mink and ferret. *J Reprod Fertil* 45: 201-209.
- Byakov, 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.
- Byakov, A. G. (1978). The anatomy and ultrastructure of the rete system in the fetal mouse ovary. *Biol Reprod* 19:720-735.
- Callebaut M. (1979). The avian ovary is an open organ. *Anat Embryol* 158: 103-119.
- Cedard, L., Haffen, K. y Guichard, A. (1968). Influence de l'hormone gonadotrope chorionique sur la production d'oestrogènes a partir d'acetate de Na et de dehydroepiandrosterone radioactifs par les gonades embryonnaires de Poulet, cultivees *in vitro*. *C R Acad Sci Ser D* 267: 118-120.
- Channing, C. P. (1966). Progesterone biosynthesis by equine granulosa cells growing in tissue culture. *Nature* 210: 12-66.
- Channing, C. P. (1969). Steroidogenesis and morphology of human ovarian cell types in tissue culture. *Journal of Endocrinology* 45:297-308.
- Channing, C.P. y Grieves, S. A. (1969). Studies on tissue culture of equine ovarian cell types: Steroidogenesis. *Journal of Endocrinology* 43:391-402.

- Channing, C.P. y Coudert, S. P. (1961). Contribution of granulosa cells and follicular fluid to ovarian estrogen secretion in the rhesus monkey *in vivo*. *Endocrinology* 98:590-597.
- Challoner, S. (1975). Studies of oogenesis and follicular development in the golden hamster. 3. The initiation of follicular growth *in vitro*. *J Anat* 119: 157-162.
- Coons, A. H. (1956). Histochemistry with labelled antibody, *Int Rev Cytol* 5:1-23.
- Dahl, E. (1970a). 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). Fine structure of the granulosa cells in the domestic fowl and the rat. *Zeitschrift Fur Zellforsch und Mikroskopische Anatomie*, 119:58-67.
- Dahl, E. (1971). Studies of the fine structure of ovarian interstitial tissue, 5. Effects of gonadotropins on the thecal gland of domestic fowl. *Z Zellforsch*, 113:133-150.
- Dahl, E. (1971). 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.
- Deanesly, R. (1970). Oogenesis and development of the ovarian interstitial tissue in the ferret. *J Anat* 107: 165-178.
- Deanesly, R. (1975 a). Follicle formation in ginea-pigs and rabbits: A comparative study with notes on the rete ovarii. *J Reprod Fertil* 45: 371-374.
- Deanesly, R. (1975 b). Germ cell development and meiotic prophase in the fetal horse ovary. *J Reprod Fertil Suppl* 23: 547-552.
- Dorrington, J. H., Moon, Y. S., y Armstrong, D. T. (1975). Estradiol-17 $\beta$  biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats: stimulation by follicle stimulatn hormone. *Endocrinology* 97: 1328-1331.
- Dowson, A. B. y McCabe, M. (1951). The interstitial tissue of the ovary in infantile and juvenile rat. *J Morphol* 88: 543.
- Engels, J., A., Friedlander, R. L. y Eik-Nes, K. B. (1968). An effect *in vivo* of clomiphene on the rate of conversion of androstenedione-C to estrone-C and estradiol-C by the canine ovary. *Metabolism* 17:189-198.
- Erickson, G. F. y Ryan, K. J. (1976). Stimulation of testosterone production in isolated rabbit thecal tissue by LH/FSH, dibutyl cyclic AMP, PGF<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub>. *Endocrinology* 99: 452-456.
- Erickson, G.F. y Hsueh, A.J.W. (1978). Stimulation of aromatase activity by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology* 102:1275-1283.

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

Everett, N. B. (1943). Observational and experimental evidences relating to the origin and differentiation of the definitive germ cells in mice. *J Exp Zool* 92: 49-91.

Everett, J.W. (1987). Pituitary and hypothalamus. Prospectives and overviews. In: *The Physiology of Reproduction* (edited by E. Knobil and J. D. Neill). Ed. Raven Press, New York. PP 1143-1159.

Falk, B. (1959). Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants. *Acta Physiol Scand Suppl* 163, 47: 5-101.

Fell, H.B. (1925). Histological studies on the gonads of the fowl. III. The relationship of the "luteal" cells of the ovary of the fowl to the tissue occupying the atretic and discharged follicles, and the question of the homology of the latter tissue and mammalian corpus luteum. *Q J Microsc Sci* 69:591-610.

Fortune J. E. y Armstrong, D. T. (1977). Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrous rat follicles. *Endocrinology* 100: 1341-1347.

Franchi, L. L., Mnadi, A. M. y Zuckerman, S. (1962). Ovarian development and oogenesis. in *The Ovary*, Vol I (S. Zuckerman, ed.) pp 1-88. Academic Press, New York.

Fraser, H. M., Gunn, A., Jeffcoate, S.L. y Holland, D.T. (1974). Effect of active immunization to luteinizing hormone releasing hormone on serum and pituitary gonatrophins, testes and accessory sex organs in the male rat. *J Endocr* 63:399-406.

Fraser, H.M., Jeffcoate, S.L., Gunn, A. y Holland, D.T. (1975). Effect of active immunization to luteinizing hormone releasing hormone on gonadotrophin levels in ovariectomized rats. *J Endocr* 64,191-192.

Galli, F. y Wassermann, G. F. (1972). Steroid biosynthesis by testes and ovaries of 15-day-old chick embryos. *Gen Comp Endocrinol* 19:509-514.

Galli, F. y Wassermann, 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). In *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. (D.J. Bell and B.M. Freeman, eds). 3:1149- 1168 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 prevulatory 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 & J. Mclelland. London: Academic Press.

Gilbert, A. B. (1988). Developmental Biology. Ed. Sinauer Associates Inc Publisher S. Sunderland, Massachusetts p 843.

Gilman, J. (1948). The development of the gonads in man, with a consideration of the whole fetal endocrines and the histogenesis of ovarian tumors. *Contrib Embryol* 32: 81-131.

Gondos, B. (1975). Surface epithelium of the developing ovary. Possible correlation with ovarian neoplasia. *Am J Pathol* 81: 303-320.

Gore-Langton, R.E. y Armstrong, D.T. : (1988). Follicular steroidogenesis and its control. In: *Physiology of Reproduction*, Vol.1. Edited by E. Knobil, J. D. Neill, L.L. Ewing, G.S. Greenwald, C.L. Markert, D.W. Pfaff. Raven Press, Ltd. New York, Chapter 10. pp.331-385.

Grassi-Milano, E. y Pitini, A.M. ( 1978). Effets morphologiques des hormones hypophysaires gonadotropes sur le développement de testicules et d'ovaries d'embryons de poulet en culture organotypique. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 67:145-156.

Guichard, A., Cedard, L. y Haffen, K. (1973a). Aspect comparatif de la synthese de steroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de poulet a differents stades du développement (étude en culture organotypique a partir de précurseur radioactifs). *Gen. Comp. endocrinol.*, 20:16-28.

Guichard, A., Cedard, L. y Haffen, K. (1973b). Metabolisme de la pregnenolone 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., Scheib, D. y Haffen, K. (1977a). Radioimmunoassay of steroid produced by cultured chick embryonic gonads: Differences according to age, sex, and side. *Gen Comp Endocrinol* 32:255-265.

Guichard, A., Cedard, L., Mignot, Th.M., Scheib, D. y Haffen, K. (1977b). Radioimmunoassay of steroids produced by cultured chick embryonic gonads: Differences according to age, sex, and side. *Gen Comp Endocrinol* 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.

Guraya, S.S., Greenwald, G.S. (1964a). Histochemical study of interstitial gland in the rabbit ovary. *Am J Anat* 114:495-520.

Guraya S.S., Greenwald, G.S. (1964b). A comparative histochemical study of interstitial tissue and follicular atresia in the mammalian ovary. *Anat Rec* 149:411-434.

Haffen, K. y Cedard, L. (1968). Etude en culture organotypique *in vitro*, du métabolisme de la déhydroépiandrosterone et de la testostérone radioactives, par les gonades normales et intersexuées de l'embryon de poulet. *Gen Comp Endocrinol* 11: 220-234.

Hamilton, W. J. y Mossman, H. W. (1972). Human Embryology. Williams and Wilkins, Baltimore.

Halmi, N. S. y Krieger, D. (1983). Immunocytochemistry of ACTH-related peptides in the hypophysis. In: The Anterior Pituitary Gland. edited by A. S. Bhatnagar pp 1-15 Raven Press, New York.

Hall, P.F. Young D.G. (1968). Site of action of trophic hormones upon the biosynthetic pathways to steroid hormone. Endocrinology 82:559.

Hammond, R. W., Tood, H. y Hertelendy, F. (1978). Effectt of bovine LH, on steroidogenesis in avian granulosa cells. IRCS 6:452.

Hammond, J. 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.

Hammond, R.W., Burke, W.H. y Hertelendy, F. (1981): Influence of follicular maturation of progesterone release in chicken granulosa cells in response to turkey and ovine gonadotropins. Biol Reprod 24: 1048-1055.

Harris, G. W. (1937). Introduction of ovulation in the rabbit by electrical stimulation of the hypothalamo-hypophysial mechanism. Proc Roy Soc (London) Ser B 122: 374-394.

Harris, G. W. (1955). "Neural Control of the Pituitary Gland". Edward Arnold, London.

Harris, G. W. (1961). The pituitary stalk and ovulation. In "Control ovulation" (C. Villee, ed.) pp 56-74. Pergamon Press, London.

Harrison, R. J. (1962) The structure of the ovary in mammals, in: The ovary, Vol 1 (S. Zuckerman, ed.) pp 143-187. Academic Press, New York.

Hodges, R.D. (1974). The reproductive system. In: The Histology of the fowl. Academic Press, New York pp 300-414.

Houssay, B.A. Biasotti, A. y Sammartino, R. (1935). Modifications fonctionnelles de l'hypophyse après les lésions infundibulo tubériennes chez le crapand. C R Soc Biol (Paris) 120:275-227.

Huang, E. S. y Nalbandov, A. V. (1979). Synthesis of sex steroid by cellular components of chicken follicles Biol Reprod 20:442-543.

Igarashi, M. y Mc Cann, S. M. (1964). A hypothalamic follicle stimulating hormone releasing factor. Endocrinology 74:446-452.

Igarashi, M. y Mc Cann, S. M. (1964). A hypothalamic follicle stimulating hormone releasing factor. Endocrinology 74: 446-452.

Igarashi, M., Taya K., Ishikawa, J. y Yamasaki, M. (1974). Evidences for the existences of FSH-RF distinct from LH-RH/FSH-RH. In "Biological Rhythms in Neuroendocrine activity" (M. Kawakami, ed.) pp 91-101. Igaku Shoin, Tokyo.

Ioannou, J. M. (1964). Oogenesis in the guinea pig. *J Embryol Exp Morphol* 12 :673-691.

Jeppesen, T. (1975). Surface epithelium of the fetal guinea-pig ovary. A light and electron microscopic study. *Anat Rec* 183:499-515.

Johnson, A.L., and 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., and Van Tienhoven, A. (1981). Pharmacokinetics of oestradiol-17 $\beta$  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.

Lieberman, M. E. Barnea A. Bauminger, S. Tsafiri, A. y Collins, W. P., y Lindner, H. R. (1975). LH effect on the pattern of steroidogenesis in cultured Graafian follicles of the rat: Dependence on macromolecular synthesis. *Endocrinology* 96: 1533-1542.

Lipner, H. y Cross, N. L. (1968). Morphology of the membrana granulosa of the ovarian follicle. *Endocrinology* 82: 638-641.

Lowry, O.H., Rosenbrought, N. J., Farr, A. L. y Randell, R. J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

Luchy, A. W., Schreiber, J. R., Hillier, S. G., Schulman, J. D. y Ross G. T. (1977). Progesterone production by cultured preantral rat granulosa cells: Stimulation by androgens. *Endocrinology* 100: 128-133.

Mallory, F. B. (1900). A contribution to staining methods, *J Expe Med* 5:15-20.

Marrone, B. L. y Hertelendy, F. (1983). Steroidogenesis by the avian cells: effects of luteinizing hormone and substrate availability. *Am J Physiol (Endocrinol Metab 7)* 244:E487-493.

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., Buckingham, K.D. y Hertelendy, F. (1985). Analysis of steroid metabolites produced by theca cells from the adult domestic hen. *J Steroid Biochem* 23 (3):375-378.

Marrone, B. L. (1986). Ovarian steroidogenesis in vitro during the first month posthatching in the domestic chick: Gonadotropin responsiveness and progesterone metabolism. *Gen Comp Endocrinol* 1662:62-90.

Mc Cann, S. M., Talainsnik, S. y Firdman, H. M. . (1969). L-H releasing activity in hypothalamic extracts. *Proc Soc exp Biol Med* 104: 432-434.

- Mc Cann, S. M. y Porter, J. C. (1969). Hypothalamic pituitary stimulating and inhibiting hormones. *Physiol Rev* 49: 240-248.
- Mc Manus, J.F.A. (1946). Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature* 158:202.
- Merchant-Larios, H. (1978). Ovarian differentiation In: *The Vertebrate Ovary*, (Ed. by R. E. Jones), Plenum Press. New York and London pp 47-77.
- Midgley, Jr. A. R. (1972). Gonadotropin binding to frozen sections of ovarian tissue. In: *Gonadotropins* (Ed. by B. B. Soxena), C. G. Beiling and H. M. Gandy pp 248-260 Wiley-Interscience, New York.
- Moon, Y. S., Tsang, B. K., Simpson, C., y Armstrong, D.T. (1978): 17 $\beta$ -Estradiol biosynthesis in cultured granulosa and thecal cells of human ovarian follicles: stimulation by follicle-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 47:263-267.
- Moore, K. L. (1989). *Embriología Clínica*. Ed. Interamericana, McGraw-Hill. México. p 509.
- Moseman, H. W. y Duke, K. L. (1973). *Comparative Morphology of the Mammalian Ovary* pp 190-209. University of Wisconsin Press, Madison.
- Nakane, P. K. (1970). Classifications of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J Histochem Cytochem* 18: 9-20.
- Narbaitz, R., y Kolodny, R. (1964). 5  $\beta$ -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. y de Robertis, E. M. (1968). Postnatal evolution of steroidogenic cells in the chick ovary. *Histochemie* 15: 187-193.
- Nitta, H., Osawa, Y. y Bahr, J. M. (1991). Two populations of steroidogenic cells in the theca layer. In: *Regulatory Processes and Gene Expression in the Ovary*. (Gibori G. ed.) Sero Sero Press.
- Patten, B. M. (1953). *Human Embryology*. McGraw-Hill, New York p 678.
- Pedernera, E., Gómez, Y., Velázquez, P., Juárez-Oropeza, M.A. y González del Pliego M. (1988). Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. *Gen Comp Endocrinol*, 71:153-162.
- Pedernera, E., Velázquez, P., Gómez, Y. y González del Pliego, M. (1989). Isolation of steroidogenic cell subpopulations in the follicular theca of the ovary in the domestic fowl. In: *"Growth Factors and the Ovary"*. (A. N. Hershfield, ed.) pp 351-355 Plenum Press, New York.
- Peters, H. (1969). The development of the mouse ovarii from birth to maturity. *Acta Endocrinol* 62: 98-116.

- Peters H., Byskov, A. G., Himelstein-Braw R. y Faber M. (1975). Follicular growth: The basic event in the mouse and human ovary, *J Reprod Fertil* 4: 559-566.
- Peters, H. (1976). Intrauterine gonadal development. *Fertil Steril* 27: 493-500.
- Peters, H. (1976). Folliculogenesis in Mammals. In: *The Vertebrate Ovary. Comparative Biology and Evolution*, (R.E. Jones, ed.) Plenum Press, New York pp 121-144.
- Porter, T.E., Hargis, B.M., Slesby, J.L. y El Halawani, M.E. (1989). Differential steroid production between theca interna and theca externa cells: A three-cell model for follicular steroidogenesis in avian species. *Endocrinology* 125:109-116.
- Ramirez, V. D. y McCann S. M. (1963). A highly sensitive test for LH-releasing activity: the ovariectomized, oestrogen progesterone-blocked rat. *Endocrinology* 73: 193-198.
- Rao, M. C., Richards, J. S., y Midgley, A. R., Jr. (1978). Hormonal regulation of cell proliferation in the ovary. *Cell* 14: 71-78.
- Rasmussen, A. T. (1938). Innervation of the hypophysis. *Endocrinology* 23: 263-278.
- Reeves, J. J. (1988). *Endocrinology of Reproduction*. In: *Reproduction in the farm animals* (Edited by Hafez, E.S.E.). Lea & Febiger, Philadelphia pp 85-109.
- Rennels, E. G. (1951). Influence of hormones on the histochemistry ovarian interstitial tissue in the immature rat. *Am J Anat* 88:63.
- 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.
- Richards, J.S. y Kersy, K. A. (1979). Changes in theca and granulosa cell function in antral follicles developing during pregnancy in the rat: gonadotropin receptors, cyclic AMP and estradiol-17 $\beta$  Biol Reprod 21:1185.
- Richards, J. S., Jonassen, J. A. y Kersey, K.A. (1980). Evidence that changes in tonic luteinizing hormone secretion determine the growth of preovulatory follicles in the rat. *Endocrinology* 107:641-647.
- Ryan, K.J., y Short, R.V. (1965). Formation of estradiol by granulosa and thecal cells of the equine ovarian follicle. *Endocrinology*, 76:108-114.
- Schally, A. V., Redding, T. W. Bowers, C. Y. y Barret, J.F. (1969). Isolation and properties of porcine thyrotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 244: 4077-4088.
- Schally, A. V., Arimura A., Baba, Y., Nair R. M. G., Matsuo, H. Redding, T. W., Debeliuk, L. y White (1971a). Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem, Biophys Res Commun* 43: 393-399.

- Schally, A. V., Arimura, A., Kastin, A. J., Matsuo, H., Baba, Y., Reading, T. W., Nair, R. M. G., Debeljuk, L y White, W. F. (1971b). Gonadotrophin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle stimulating hormones. *Science*, N. Y. 173: 1036-1038.
- Scharrer, E. y Scharrer, B. (1954). Hormones produced by neuro-secretory cells. *Recent Prog Horm Res* 10: 183-240.
- Scheib, D. y Haffen, K. (1967). Etude histochemique de la 3 $\beta$ -hydroxysteroides deshydrogenase desjeunes 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 $\beta$  et 17 $\beta$ ) dans les gonades de la caille (Coturnix coturnix japonica) et du poulet (Gallus domesticus): Etude histoenzimologique comparative. *Gen. and Comp. Endocrinol.*, 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.
- Scheffe, H. (1953). A method for judging all contrasts in the analysis of variance. *Biometrika* 40:87-104.
- Short, R. V. (1962). Steroids present in the follicular fluid of the cow. *J Endocrinol* 23: 401-411.
- Short, R. V. (1964). Ovarian steroid synthesis and secretion *in vivo*. *Recent Progr Horm Res* 20: 303-340.
- Sturkie, P.D. (1976). *Avian physiology*. Ed. Springer-Verlag, New York pp 302-346.
- Stahl, A., y Carlon, N. (1973). Morphogénèse des cordons sexuels et signification de la zone médullaire de la gonade chez l' embryon de poulet. *Acta Anat (Basel)* 85:248-274.
- Teng, C.T., y Teng, C.S. (1977a). 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. (1977b). 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):1337-1343.
- Teng, C. T., Teng, C.S, Bousfiel, G.R, Liu, W.K, y Ward, D.N. (1982). Differentiation response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. *Gen Comp Endocrinol* 48:325-332.
- Teng C. T. (1982). Differential response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. *Gen Comp Endocrinol* 48: 325-332.

- Tsang, B. K. Moon, Y.S., Simpson, C.W. y Armstrong, A.T. (1979). Androgen biosynthesis in human ovarian follicles: cellular source gonadotropic control, and adenosine 3',5'-monophosphate mediation. *J Clin Endocrinol Metab* 48:153.
- Van Wageningen, G. y Simpson, M. E. (1965). Embryology of the ovarii and testis *Homo sapiens* and *Macaca mulatta*. Yale University Press, New Haven.
- Velázquez, P.N., Gómez, Y., González del Piiego, M. y Pedernera, E. (1988). Cambios en la actividad esteroidogénica de la teca de folículos preovulatorios de aves. XXXI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Queretaro, México. C-184.
- Von Kolliker, A. (1898). Über die Markkanäle und Markstränge in den Ejerstocken junger Hundinnen. *Verh Anat Ges* 14:149-156.
- Wartenberg, H. (1983). Germ cell migration induced and guided by somatic cell interaction. *Bibl Anat* 24:93-110.
- Watzka, M. (1961). Normale Entwicklungsgeschichte der Gonaden und der Geschlechtsgänge, in: *Die Intersexualität* (C. L. Overzieher, ed.). Thieme, Stuttgart.
- Wells, J.W. y Gilbert, A.B. (1984). Steroid hormone production by the ovary. In "Physiology and Biochemistry of the domestic fowl" (B.M. Freeman, ed.), Vol. 5, pp. 323-343. Academic Press, New York/London.
- 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.-P. (1971). Biosynthese d' oestrogenes par les ébauches gonadiques de poulet. *Gen Comp Endocrinol* 16:391-397.
- Wildt, L., Hausler, A., Marshall, G., Hutchinson, J. S., Plant, T. M., Blechetz, P. E. y Knobil, E. (1981). Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 109:376-385.
- Willier, B. H. (1939). Embryonic development of sex. In *Sex and internal secretions*, 2nd ed. (E. Allen ed. ) pp 64-144 Bailliere, Tindal and Cox, London.
- Wilson, S. C. y Sharp, P. J. (1973). Variation in plasma LH levels during the ovulatorii cycle of the hen, *Gallus domesticus*. *J Reprod Fertii* 35: 561-564.
- Wise, P.M., Rance, N., Barr, G. D. y Barrwclough, C. A. (1979). Further evidence that luteinizing hormone-releasing hormone also is follicle-stimulating hormona-releasing hormone. *Endocrinology* 104-940-947.
- Woods J. E., Weeks, R. L. (1969). Ontogenesis of the pituitary-gonadal axis in the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 13:242-254.
- Woods, J. E., y Erton, L.H. (1978). The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 36:360-370.

Woods, J. E., Menella, J. A. y Thommes, R.C. (1981). The hypothalamic adenohypophyseal gonadal axes in the developing chick embryo. Gen Comp Endocrinol 45:66-73.

Woods, J.E. y D.M. Brazzil. (1981). Plasma 17 $\beta$ -estradiol levels in the chick embryo. Gen Comp Endocrinol 44:37-43.

Wyburn, G. M., Aitken, R. N. C. y Johnston, H. S. (1965). The ultrastructure of the zona radiata of the ovarian follicle of the domestic fowl. J Anat 99: 469-484.

Younglai, E. V. y Short, R. V. (1970). Pathways of steroid biosynthesis in the intact Graafian follicle of mares in oestrus. J Endocrinol 47: 321-331.

Seleznik, A. J., Midgley, A. R. Jr., y Reichert, L. F., Jr. (1974). Granulosa cell maturation in the rat: Increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone *in vivo*. Endocrinology 95: 818-824.

Samboni, L. y Merchant-Larios, H. (1973). The fine morphology of mouse primordial germ cells in extragonadal locations. Am J Anat 137:299-336.

## Morphological Changes in the Ovary of Newly Hatched Chickens Treated with Chorionic Gonadotropin during Embryonic Development

G. GONZÁLEZ-MORAÑA, M. GONZÁLEZ-DELELLI-PERAZO, and E. PEDERSEN

Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de México, México, D.F. 04510, México

Accepted October 9, 1984

The present study describes morphological changes produced in the ovary of newly hatched chickens by treatment with human chorionic gonadotropin (hCG). Morphometric measurements of the volume of steroidogenic cells and structures of the ovarian medulla were performed in controls and experimental chickens treated with hCG (10 IU embryo) at 13, 15, and 17 days of embryonic development. After hCG treatment, the volume of interstitial cell cords increased, and modifications in poorly differentiated cells neighbouring the interstitial cells were also observed. Other changes obtained after hCG treatment were an increment in the development of the vascular system and blood capillaries, as well as a reduction in the number of germ cells in the stroma of the ovarian medulla. © 1985 Science Press, Inc.

Ultrastructural studies have shown the presence of steroidogenic cells in the medullary cords of the chick embryo ovary since the 8th day of development (Narbutz and Adler, 1966; Jordanov *et al.*, 1978). The presence of  $\Delta^5,3\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase activity in the ovarian medullary cords of the chick embryo confirms the steroidogenic function of these structures (Narbutz and Kolodny, 1964; Scheib and Haffen, 1967, 1969).

By the use of radioactive precursors, it has been demonstrated *in vitro* that the ovary of the chick embryo can produce  $17\beta$ -estradiol and estrone since the 7th day of development (Haffen and Cedard, 1968; Wenger and Zers, 1971; Galli and Wassermann, 1973; Guichard *et al.*, 1973). The level of secretion of these hormones has also been measured by radioimmunoassay (Guichard *et al.*, 1977a, b). Using immunofluorescent cytochemical methods, the

presence of  $17\beta$ -estradiol and estrone in undifferentiated gonads of chick embryos at 3-5 days of development has been described (Woods and Ertan, 1978).

The effect of luteinizing hormone (LH), or human chorionic gonadotropin (hCG), on steroid secretion in the chick embryo ovary has been studied by several authors. The incorporation of radioactive precursors into estrone and estradiol was enhanced in 10- to 18-day-old chick embryo ovary after LH or hCG treatment (Cedard *et al.*, 1968; Akram and Wenger, 1974). The secretion of estradiol and testosterone was increased after hCG treatment in the ovaries of 8- to 18-day-old chick embryos maintained *in vitro* (Teng and Teng, 1977; Guichard *et al.*, 1979; Teng *et al.*, 1982). Similar results were obtained with ovarian cells in monolayer culture (Teng and Teng, 1979). After LH treatment, estradiol plasma level was increased in chick embryos of 7.5-9.5 days of incubation (Woods *et al.*, 1981).

As it would be important to analyze the ovarian structures which are modified after gonadotropin stimulation, in the present

© To whom reprint requests should be addressed at: Departamento de Embriología, Facultad de Medicina UNAM, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510, México.

paper we describe the morphological changes produced in the ovary of newly hatched chickens treated with hCG since the 13th day of embryonic development.

#### MATERIAL AND METHODS

**Fertile eggs** (White Leghorn) were incubated at 37.5° in a forced draft incubator. The embryos were treated with 1.0 U embryo of hCG (Pregnyl, Organon) at Days 13, 15, and 17 of incubation. A group of embryos received single injections on Day 17. Control embryos were treated with NaCl 0.9%. The hormone was deposited on the chorioallantoic membrane through a small opening in the egg shell. All the animals were killed within 24 hr after hatching. The left ovaries were carefully dissected, weighed, and homogenized to determine the total protein content using bovine albumin fraction V (Sigma) as standard ( $1.4 \times 10^{-4} = 6.67 \text{ cm}^2$ ) (1) solution (Lowry et al., 1951). For morphological studies, the ovary was fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.15 M phosphate buffer, pH 7.4, followed by 1% osmium tetroxide. The tissue was dehydrated and embedded in Epon 812. Sections of 1  $\mu\text{m}$  in thickness for light microscopy were stained with toluidine blue.

An area of the outer medulla (540  $\mu\text{m}^2$ ) was used in order to accomplish morphometric studies. The volume occupied by interstitial cell cords and by vascular channels was measured by the point counting method to 95% of precision, and expressed as a percentage of the total volume ( $V = \text{points over object profile} \times 100$ ) (total points applied to micrograph) (Williams, 1977). The total number of germ cells located in the stroma of the ovarian medulla studied was also determined. The differences between groups were statistically evaluated by analysis of variance ( $F$ ), Student's  $t$  test, and the test of Scheffe (1953) for multiple contrast.

#### RESULTS

The left ovary of newly hatched chickens treated with hCG since the 13th day of embryonic development (three doses) exhibited a significant increment in total protein content (Table 1). The difference in the wet weight between groups, however, was not statistically significant. Histological studies showed that ovarian cortex was not apparently modified in chickens treated with hCG; while in the medullary region, several changes caused by hCG treatment were observed.

Interstitial cells were found in the ex-

TABLE 1  
WET WEIGHT AND TOTAL PROTEIN CONTENT OF THE OVARY OF THE NEWLY HATCHED CHICKS TREATED WITH hCG (TOTAL DAYS 13, 15 AND 17 OF EMBRYONIC DEVELOPMENT)

Treatment	Wet weight (mg ovary)	Total protein content ( $\mu\text{g ovary}$ )
Control	5.21 $\pm$ 0.19 $n = 33$	540.0 $\pm$ 22.2 $n = 32$
hCG	5.62 $\pm$ 0.24 $n = 39$	619.5 $\pm$ 23.5 $n = 39$

Note: Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance: wet weight: control vs hCG, not significant; Total protein content: control vs hCG,  $P < 0.02$ .

ternal medullary zone of the ovary. These cells were irregular in shape, with a highly vacuolated cytoplasm, and were grouped into cords or clusters surrounded by stromal cells. Small nerves penetrated into the interstitial cell cords, the presence of poorly differentiated cells, blood vessels, elements of the lacunar system, and germ cells, was also noted (Fig. 1a, c).

The hCG-treated ovary showed an increment in the volume of interstitial cell cords (Table 2). It was difficult to appreciate differences in the amount of lipid inclusions between hCG-treated interstitial cells and controls. Poorly differentiated cells located between the groups of interstitial cells exhibited lipid droplets in their cytoplasm. When chickens were treated with hCG, the lipid droplets became more prominent. The images observed indicate the possible transformation of these cells into mature interstitial cells (Fig. 1c, d).

After hCG treatment, the ovary presented a greater development of vascular channels in the external medullary zone compared to that of the control (Fig. 1b). These vessels included blood capillaries, veins, and elements of the ovarian lacunar system. The increment in the vascular channels observed after hCG treatment

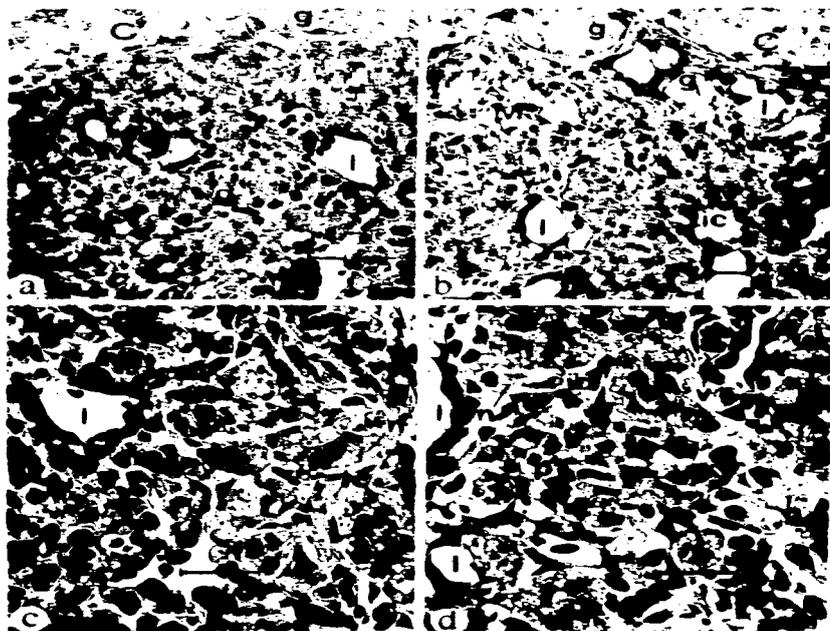


FIG. 1. Histology of the left ovary observed in control and hCG-treated newly hatched chicken in sections of about 1  $\mu$ m thick, stained with toluidine blue. Magnification is represented by a 20  $\mu$ m scale. (a) Control ovary. The medullary zone (M) close to the cortex (C) presents interstitial cell cords (I), blood vessels (V), nerves (N), and channels of the lacunar system (L). Germ cells (G) can also be identified in the ovarian medulla in hCG-treated ovary. The ovarian medulla displays an increment of interstitial cell cords and a high development of blood vessels. Germ cells were observed in the wall or inside the lacunar system (L). Control ovary. At a higher magnification groups of psittac differentiated cells (P) located between the interstitial cell cords can be observed (a). hCG-treated ovary. A great development of interstitial cell cords and an increment of the lipid droplets in the poorly differentiated cells is displayed.

(Table 2) was mainly determined by a greater development of components of the lacunar system and blood capillaries.

Germ cells in the primary oocyte stage were observed in the external medullary zone of the control ovary (Fig. 1a). These

TABLE 2  
MORPHOMETRIC MEASUREMENTS OF THE MEDULLARY CORDS, VESSELS, AND GERM CELLS IN 540  $\mu\text{m}^2$  OF THE EXTERNAL MEDULLARY ZONE IN THE CHICKEN OVARY TREATED WITH hCG

Treatment	Interstitial cell cords (a.s.)	Medullary vessels (a.s.)	Germ cells (total number)
Control	18.46 $\pm$ 1.35 <i>n</i> = 18	8.45 $\pm$ 0.95 <i>n</i> = 18	3.84 $\pm$ 1.17 <i>n</i> = 18
hCG (Day 17)	22.73 $\pm$ 1.75 <i>n</i> = 13	18.49 $\pm$ 1.75 <i>n</i> = 13	0.92 $\pm$ 0.32 <i>n</i> = 13
hCG (Days 13, 15, and 17)	24.1 $\pm$ 1.96 <i>n</i> = 9	20.83 $\pm$ 1.83 <i>n</i> = 9	0.67 $\pm$ 0.4 <i>n</i> = 9

Note. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance: interstitial cell cords, control vs hCG (Day 17), *P* < 0.02, vs hCG (Days 13, 15, and 17), *P* < 0.05; Medullary vessels, control vs hCG (Day 17), *P* < 0.001, vs hCG (Days 13, 15, and 17), *P* < 0.001; Germ cells, control vs hCG (Day 17), *P* < 0.05, vs hCG (Days 13, 15, and 17), *P* < 0.05.

cells were located in the stromal tissue, close to the lacunar system or inside the lacunar system channels. In the hCG-treated ovaries, the total number of germ cells in the studied area of the stroma was significantly reduced (Table 2).

#### DISCUSSION

The ovary of the chicken begins to respond to gonadotropin stimulation during embryonic development. This fact has been demonstrated by several authors (Teng and Teng, 1977, 1979; Teng *et al.*, 1982; Cedard *et al.*, 1968; Woods *et al.*, 1981) and confirmed *in vivo* by the present results. The response of chick ovary to hCG appears earlier in the development of this organ than in the ovary of rats and rabbits. These mammals are not endowed with specific LH/hCG receptors in the ovary during fetal and early postnatal development (Muller *et al.*, 1979; Siebers *et al.*, 1977; George *et al.*, 1979).

The interstitial cells of the medullary cords present the ultrastructural and histochemical characteristics of steroidogenic cells (Narbaitz and Adler, 1966; Jordanov *et al.*, 1978; Scheib and Haffen, 1969). Our observations that the volume of interstitial cell cords increased after hCG

treatment suggests that these cells are hCG effectors in the chick embryo ovary. Postnatal studies of interstitial cells in the ovarian medulla showed that these cells originate the theca cells of ovarian follicles (Narbaitz and De Robertis, Jr., 1968), which are LH target cells in the adult animal (Huang *et al.*, 1979). The changes produced in poorly differentiated cells which surround the interstitial cell cords demonstrated that this type of cell is also modified by hCG. The transformation of relatively undifferentiated cells into mature interstitial cells could explain the increase in the volume of interstitial cell cords observed following hCG treatment. A previous study on the effect of LH and FSH in organ culture of ovaries from 10-day-old chick embryos did not find evident changes in the medullary cords by gonadotropin treatment (Girasi-Milano and Pittini, 1978), a disagreement with the present results which could be explained by differences in experimental conditions.

The lacunar system presents a great development in the hCG-treated ovary. Since there is no agreement on the function of the lacunar system (Callebaut, 1979), it is difficult to discuss the physiological significance of the changes produced by hCG stimulation. The great development of

blood capillaries after hCG treatment could be interpreted as a reaction associated with glangular stimulation.

Germ cells are normally located in the chick embryo ovarian cortex, but a certain number is observed in the medulla. To our knowledge the posterior evolution of the avian germ cells located in the ovarian medulla has not been described. The number of germ cells located in the medullary stroma was reduced following the treatment with hCG. Therefore, the migration and/or removal of the germ cells in the ovarian medulla is influenced by hormonal changes. Probably the increased secretion of steroid hormones by hCG stimulation (Teng and Teng, 1977) causes a modification in the germ cell number.

The changes produced in the chick ovary by a single injection of hCG at Day 17 was as effective as three injections at Days 13, 15, and 17. Therefore, the most significant effect of hCG treatment is probably produced in the last 4 days of prenatal development.

We conclude that hCG stimulation during prenatal development produces an increment in steroidogenic cell cord volume, a high development of the lacunar system and blood capillaries, as well as a reduction in the number of germ cells in the external medulla of the left chick ovary.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank M. C. Priscilla Castillo for revising the manuscript and Q. E. B. Amalia Marquez for help in photographic techniques.

#### REFERENCES

- Akram, H., and Weniger, J. P. (1974). L'hypophyse est sans influence sur la synthèse d'oestrogènes chez l'embryon de Poulet. *C. R. Acad. Sci. Ser. D* 278, 2669-2670.
- Callebaut, M. (1979). The avian ovary is an open organ. *Anat. Embryol.* 158, 103-119.
- Cedard, L., Haffen, K., and Guichard, A. (1968). Influence de l'hormone gonadotrope chorionique sur la production d'oestrogènes à partir d'acétate de Na et de déhydroépiandrosterone radioactifs par les gonades embryonnaires de Poulet. *Cult. in vitro. C. R. Acad. Sci. Ser. D* 267, 118-120.
- Collip, J. E., and Wassermann, G. J. (1973). Steroid biosynthesis by gonads of 7- and 10-day-old chick embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.* 21, 77-83.
- George, F. W., Simpson, J. R., Milewich, L., and Wilson, J. D. (1979). Studies on the regulation of the onset of steroid hormone biosynthesis in fetal rabbit gonads. *Endocrinology* 105, 1100-1106.
- Grasso-Milano, E., and Pittini, A. M. (1978). Effets morphologiques des hormones hypophysaires gonadotropes sur le développement de testicules et d'ovaires d'embryons de poulet en culture organotypique. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 67, 145-156.
- Guichard, A., Cedard, L., and Haffen, K. (1973). Aspect comparatif de la synthèse de stéroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de Poulet à différents stades du développement (étude en culture organotypique à partir de précurseurs radioactifs). *Gen. Comp. Endocrinol.* 20, 16-28.
- Guichard, A., Scheib, D., Haffen, K., and Cedard, L. (1977a). Radioimmunoassay of steroid hormones produced by embryonic chick gonads during organ culture. *J. Steroid Biochem.* 8, 599-602.
- Guichard, A., Cedard, L., Mignot, Th. M., Scheib, D., and Haffen, K. (1977b). Radioimmunoassay of steroids produced by cultured chick embryonic gonads. Differences according to age, sex, and side. *Gen. Comp. Endocrinol.* 32, 255-265.
- Guichard, A., Haffen, K., Cedard, L., Mignot, Th. M., and Scheib, D. (1979). Effects of hCG and of season on *in vitro* steroidogenesis by 18-day chick embryonic gonads. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 19, 1317-1325.
- Haffen, K., and Cedard, L. (1968). Etude en culture organotypique *in vitro* du métabolisme de la déhydroépiandrosterone et de la testostérone radioactives, par les gonades normales et intersexuelles de l'embryon de poulet. *Gen. Comp. Endocrinol.* 11, 220-234.
- Huang, F. S., Kao, K. J., and Nalbandov, A. V. (1979). Synthesis of sex steroids by cellular components of chicken follicles. *Biol. Reprod.* 20, 454-461.
- Jordanov, J., Angelova, P., Boyadineva-Michailova, A., and Bakalska, M. (1978). Ultrastructure of developing interstitial cells in chick embryonic gonad in relation to their genesis and steroidogenic function. *J. Mikrosk. Anat. Forsch.* 92, 449-464.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Mullet, C., Engel, W., and Siebers, J. W. (1979). LH/hCG receptors of the ovary during early postnatal

- development. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **197**, 1367.
- Narbutz, R., and Kofsky, J. (1964).  $\Delta^5$ - $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in differentiating chick gonads. *J. Cell. Physiol. Microsc. Anal.* **63**, 612-617.
- Narbutz, R., and Adler, R. (1966). Submicroscopical observations on the differentiation of chick gonads. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **16**, 41-47.
- Narbutz, R., and De Robertis, E. M. Jr. (1968). Post-natal evolution of steroidogenic enzymes in the chick ovary. *Histochemia* **15**, 187-193.
- Scheffe, H. (1953). A method for judging all contrasts in the analysis of variance. *Biometrics* **40**, 87-104.
- Scheib, D., and Hatten, K. (1967). Etude histochemique de la  $3\beta$ -hydroxysteroido deshydrogenase dans les jeunes gonades embryonnaires de Poulet. *C. R. Acad. Sci. Ser. D* **264**, 161-164.
- Scheib, D., and Hatten, K. (1969). Apparition et localisation des hydroxysteroido deshydrogenases ( $\Delta^5$ - $3\beta$  et  $17\beta$ ) dans les gonades de l'embryon et du poussin de la caille (*Coturnix coturnix japonica*). Etude histoenzymologique et comparaisons avec le poulet (*Gallus gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **12**, 586-597.
- Siebers, J. W., Peters, F., Zentgraf, M. J., Schmidtke, J., and Engel, W. (1977). Binding of human chorionic gonadotropin to rat ovary during development. *J. Endocrinol.* **73**, 491-496.
- Jeng, C. I., and Jeng, C. S. (1977). Studies on sex organ development. The hormonal regulation of steroidogenesis and adenosine 3',5' cyclic monophosphate in embryonic chick ovaries. *Histochem. J.* **102**, 123-134.
- Jeng, C. I., and Jeng, 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.
- Jeng, C. I., Jeng, C. S., Bousfield, G. R., Liu, W. K., and Ward, D. S. (1982). Differential response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* **48**, 325-332.
- Williams, M. A. (1977). Quantitative methods in biology. In: *Practical Methods in Electron Microscopy*, V. M. Glavert, ed. Vol. 6, pp. 6-40. North Holland, Amsterdam.
- Wenger, J. P., and Zerk, A. (1971). Biosynthese d'œstrogènes par les ébauches gonadiques de poulet. *Gen. Comp. Endocrinol.* **16**, 391-397.
- Woods, J. E., and Ertan, F. 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-adenohypophysial gonadal axes in the developing chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* **45**, 66-73.

## Ultrastructure of the ovarian medulla in the newly hatched chick treated with human chorionic gonadotropin

M. González del Pliego, G. González-Moran, and E. Pedernera

Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

**Summary.** The ultrastructural characteristics of the ovarian medulla of the newly hatched white leghorn chick were studied in control animals and compared with chicks that were treated with human chorionic gonadotropin during embryonic development. The ovarian medulla was mainly occupied by epithelial cells which formed cords or islets surrounded by a basal lamina. Within this epithelial compartment, steroidogenic cells, poorly differentiated cells and a lacunary system could be recognized. When chicks were treated with human chorionic gonadotropin, steroidogenic cells became discernible, there was an increment in the amount of cytoplasm and the area of mitochondria. Poorly differentiated cells exhibited signs of stimulation, and transitional images suggested the transformation of these cells into steroidogenic cells. The epithelial cells of the lacunary system also displayed stimulated cytoplasmic organelles. Evidence was supplied suggesting that relatively undifferentiated cells persist in the ovarian medulla until hatching and can develop into steroidogenic cells under gonadotropic stimulation.

**Key words:** Ovary · Steroid-secreting cells · Ultrastructure · Chorionic gonadotropin · Chicken

Biosynthesis of steroid hormones by the chick ovary during embryonic development has been demonstrated since the 7th day of incubation (Hafften and Cedar 1968; Wenger and Zeis 1971; Gallit and Wassermann 1973; Guichard et al. 1973). Morphological and histochemical studies have identified steroidogenic cells located in the medulla of the chick embryo ovary (Narbutz and Kolodny 1964; Narbutz and Adler 1966; Scheib and Haflen 1967; Woods and Weeks 1969; Jordanov et al. 1978). These steroidogenic cells, the interstitial cells of the ovary, are clearly identified during the last week of development, forming cell clusters with abundant cytoplasmic lipid droplets (Jordanov et al. 1978; González-Moran et al. 1985).

Treatment with luteinizing hormone (LH) or human chorionic gonadotropin (hCG) during chick embryonic development results in an increased secretion of estradiol, testosterone and progesterone by the ovary (Teng and Teng 1977; Guichard et al. 1979; Woods et al. 1981; González

et al. 1985). Morphometric measurements demonstrate that the volume of steroidogenic cells in the ovarian medulla is augmented when the embryo has been treated with hCG (González-Moran et al. 1985).

The ultrastructure of the ovarian medulla in the newly hatched white leghorn chicken treated with hCG is described in the present paper. The study was focused on steroidogenic cell morphology and other ovarian structures that are modified after gonadotropin treatment.

### Materials and methods

Fertile eggs of white leghorn chickens were obtained from the poultry farm of the Veterinary School of National University of Mexico, and incubated at 37.8°C in a forced-draft incubator. The embryos were treated with hCG (Pregnyl, Organon), 1 IU ml 0.9% saline, applied to the chorioallantoic membrane at 13, 15 and 17 days of incubation. Control embryos were treated with NaCl 0.9% solution.

Within 24 h after hatching, the animals were sacrificed by decapitation, the left ovary dissected and fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde in 0.15 M cacodylate buffer, pH 7.4 followed by 1% osmium tetroxide. The ovarian fragments were dehydrated in graded alcohols and embedded in Epon 812. Sections 1 µm thick were stained with toluidine blue for light microscopy. Grey to pale gold sections were obtained with a Reichert ultramicrotome (Ultra-cut) and stained with uranyl acetate followed by lead citrate (Reynolds 1963). The sections were observed in a EM-9S2 Zeiss electron microscope.

Morphometric measurements were performed in samples of the left ovary from controls and hCG-treated chickens. Approximately 12 micrographs randomly selected of each ovary were analysed. Micrographs were enlarged to a final magnification to 18000× or 45000×. Surface area was measured with the aid of a computer Hewlett Packard, 9825 T model, coupled to a HP 9874A digitizer. Student's test was used to compare differences between groups.

### Results

An epithelial compartment was recognized in the ovarian medulla of the newly hatched chick embryo. This compartment consisted of cords or islets of cells surrounded by a basal lamina and lacunae delimited by epithelial cells. According to the ultrastructure, two cell types could be identified within the epithelial compartment: (1) steroido-

Send offprint requests to: Dra. Margarita González del Pliego, Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, U.N.A.M., Ciudad Universitaria, México, D.F., 04510, México.

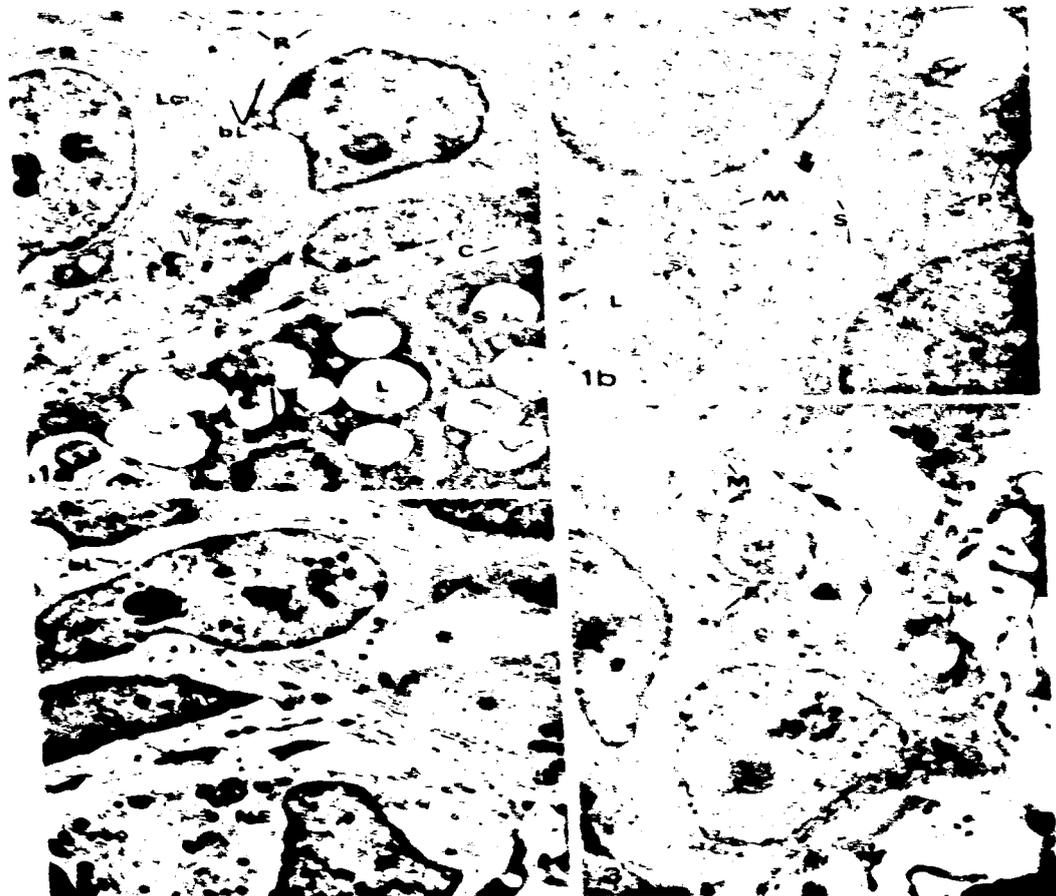


Fig. 1a. Medulla of the ovary in a newly hatched chicken. Steroidogenic cells at the low part of the micrograph. M mitochondrion with tubular cristae, S smooth endoplasmic reticulum, and L lipid droplets. Fibroblast prolongations (F) and collagen fibers (C) surround steroidogenic cells. L, lacuna with delimiting basal lamina (BL). Epithelial cells of the lacuna contain rough endoplasmic reticulum (R) and Z-polyribosomes.  $\times 12,000$ . b Two steroidogenic cells with smooth endoplasmic reticulum, mitochondria, lipid droplets at scanty polyribosomes in contact. A gap junction (arrow) between the cells.  $\times 20,000$ .

**Table 1.** Effect of hCG on the cytoplasmic area and organelles of three cellular types in the ovarian medulla of newly hatched chickens

	Steroidogenic cells		Undifferentiated cells		Lacunar cells	
	Control (n = 4)	hCG (n = 3)	Control (n = 3)	hCG (n = 3)	Control (n = 4)	hCG (n = 6)
Nucleus (average area $\mu\text{m}^2$ )	5.0 $\pm$ 1.5	5.0 $\pm$ 1.1	7.4 $\pm$ 0.4	8.1 $\pm$ 1.8	6.5 $\pm$ 0.4	8.5 $\pm$ 2.0
Cytoplasm (average area $\mu\text{m}^2$ )	20.0 $\pm$ 1.9*	27.9 $\pm$ 1.4	10.7 $\pm$ 2.3	11.8 $\pm$ 0.9	9.7 $\pm$ 1.3	12.6 $\pm$ 1.7
Mitochondria (average area per organelle $\times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ )	13.8 $\pm$ 1.0**	26.9 $\pm$ 2.9	11.2 $\pm$ 0.5*	13.6 $\pm$ 0.8	10.4 $\pm$ 0.7*	15.1 $\pm$ 1.7
Area of RER ( $10^{-3} \mu\text{m}^2$ per $\mu\text{m}^2$ cytoplasm)	—	—	3.6 $\pm$ 0.4*	5.7 $\pm$ 0.8	5.1 $\pm$ 1.1**	10.2 $\pm$ 0.8

Values represent Means  $\pm$  SEM. \*\*  $P < 0.01$ . \*  $P < 0.05$ .

genic cells in the islets or, isolated, as interstitial cells, and (2) nests or small cords of poorly differentiated cells.

Steroidogenic cells in the ovarian medulla formed islets of variable size and irregular shape. The cytoplasm of steroidogenic cells contained mitochondria with tubular cristae, numerous cisternae of smooth endoplasmic reticulum (SER) and abundant lipid droplets (Fig. 1). Mitochondria of steroidogenic cells are larger than those of poorly differentiated cells (Table 1). Junctional complexes of desmosomal type and probably gap junctions between steroidogenic cells were recognized (Fig. 1). Steroidogenic cells were surrounded by a basal lamina, although, this structure was not constant. In most of the mature steroidogenic cells islets, the basal lamina was discontinuous and replaced by collagen fibers and fibroblast prolongations which enclosed the steroidogenic cell islets (Fig. 1a). Each islet of steroidogenic cells usually received a terminal nerve branch which penetrated into the cell cluster.

The cords formed by poorly differentiated cells, were in all cases surrounded by a well-defined basal lamina. These cells presented scanty cytoplasm and few organelles, mainly polyribosomes and rough endoplasmic reticulum (RER) cisternae. The nucleus was rounded or ovoid with euchromatin and prominent nucleolus. Within these cords of poorly differentiated cells, cavities of variable size were frequently observed in the intercellular space (Fig. 2). The main volume of the epithelial compartment was represented by these relatively undifferentiated cells.

Another epithelial structure observed was the lacunar system that has been already described from light microscopy (Firket 1914; Callebaut 1979). The lacunae were lined by a single layer of cells displaying a well-defined basal lamina with a flexuous profile. In the juxtaluminal region zonulae adherentes, but not zonulae occludentes, were observed between adjacent cells. The cytoplasmic organelles and the nuclear characteristics of these cells were very similar to those of the poorly differentiated cells described in the preceding paragraph. Moreover, differences between small lacunae and poorly differentiated cords were hardly discernible (Fig. 3).

The epithelial structures were not uniformly distributed through the ovarian medulla. In outer medulla, close to the cortex layer, poorly differentiated cell cords, relatively small steroidogenic cell islets and reduced lacunae were found. In the inner medulla, large interstitial cell islets and lacunae were frequently recognized. The cords with poorly differentiated cells were not found in the deepest region of the ovarian medulla.

**Ovarian medulla in hCG-treated chicken.** Steroidogenic cells underwent obvious cytological changes in the hCG-treated group. The most relevant modification was the increment of the cytoplasmic area of the cell. The nuclear area was not modified (Table 1). In the cytoplasm, SER vesicles are well developed (Fig. 4). Mitochondria with tubular cristae were larger compared to control steroidogenic cells (Table 1). Lipid droplets tended to be augmented but the difference was not significant.

Cords of poorly differentiated cells were observed in the ovarian medulla of the hCG-treated group (Figs. 4, 5, 6). These cells displayed signs of stimulation after hCG treatment: there was an increase in RER surface area, and mitochondria presented an increment in the average area per organelle (Table 1). Transitional images that suggested the transformation of poorly differentiated cells into steroidogenic cells were observed (Fig. 7). Mitochondria with tubular cristae, SER vesicles and lipid droplets were frequently observed in transitional cell clusters delimited by a basal lamina.

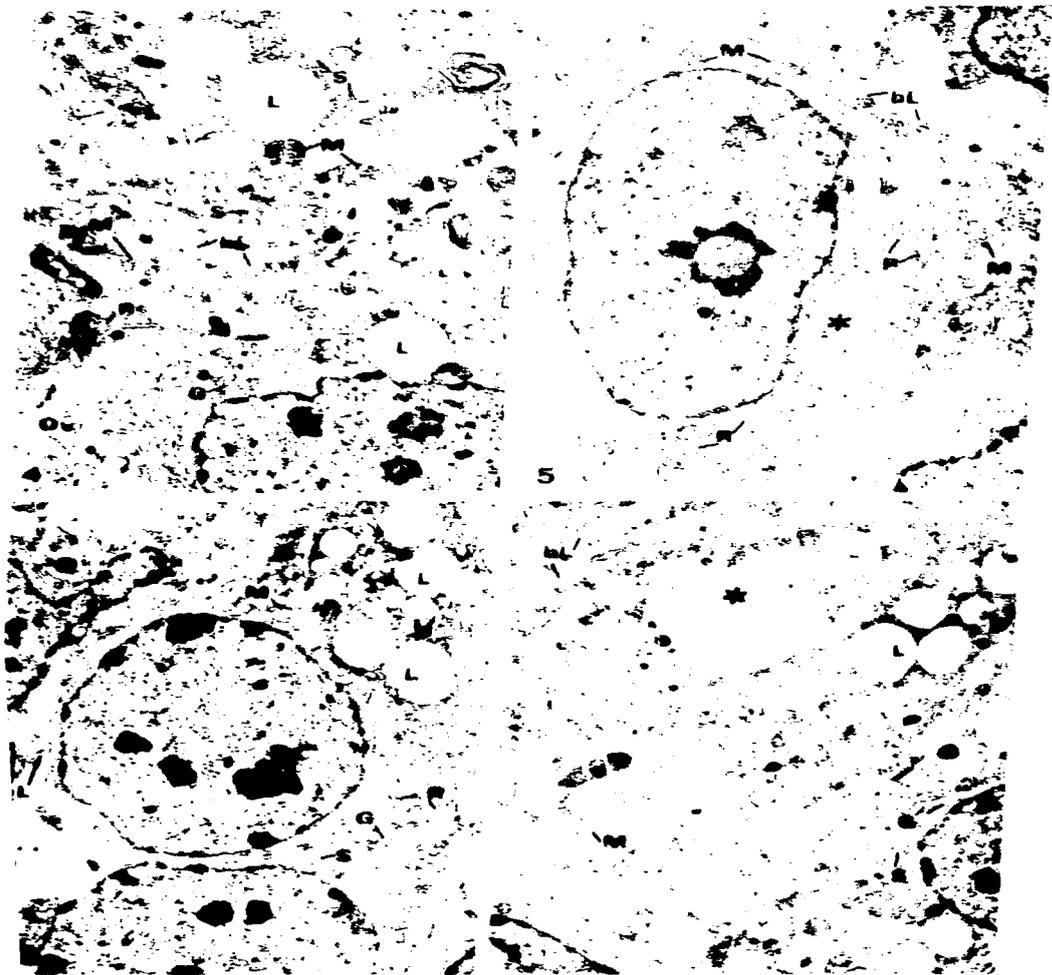
Epithelial cells of the lacunar system were modified with the hCG treatment (Fig. 8). Mitochondria and RER profiles were augmented in the epithelial cells of the lacunae (Table 1).

## Discussion

The main component of the ovarian medulla in the newly hatched chicken is the epithelial compartment. Within this compartment, steroidogenic cells have been clearly recognized by their cytoplasmic organelles (Christensen 1963;

**Fig. 2.** Outer ovarian medulla of the control ovary. Cluster of poorly differentiated cells ( $P$ ) is delimited by a continuous basal lamina ( $BL$ ).  $\times$  cavity into intercellular space.  $NA$ , nerve branch.  $\times 10000$ .

**Fig. 3.** Part of the lacunar system in the medulla of the control ovary delimited by a  $BL$  basal lamina. Cells with scanty cytoplasm, few mitochondria ( $M$ ) and poor development of rough endoplasmic reticulum ( $R$ ). Desmosomes ( $des$ ) between adjacent cells.  $\times 10000$ .



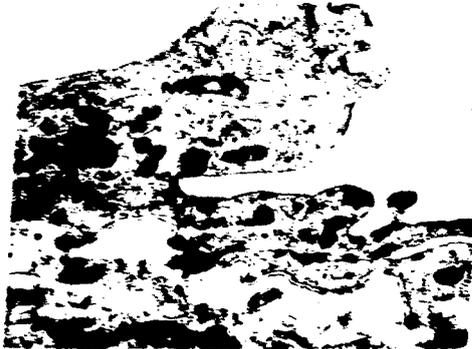


Fig. 3. A detail of the lacunar epithelium in the ovary of the newly hatched chick at 0 hr of the treatment with hCG. *M* mitochondria; *R* rough endoplasmic reticulum; *E* epithelium; *BL* basal lamina; *arrow* desmosomes (arrow) between adjacent cellular membranes are shown.  $\times 23,500$ .

Blanchette 1966). The modifications observed into steroidogenic cells after hCG treatment are in agreement with previous results that have correlated an increase in SER vesicles and mitochondria with stimulation of the steroidogenic cell function (Dahl 1971; Mori and Christensen 1980; Zirkkin et al. 1982). The present ultrastructural findings confirm previous results that have demonstrated an increase in the amount of steroidogenic cells in the ovary of hCG-treated chickens (Gonzalez-Moran et al. 1985).

The epithelial compartment of the ovarian medulla in the newly hatched chick shows cords of poorly differentiated cells. These epithelial cords probably represent the persistence of primary medullary cords. On the other hand, the lacunar system is originated by a vacuolization of these medullary cords (Narbutz and Adler 1966; Stahl and Carion 1973), and is formed by relatively undifferentiated cells. The significance of the medullary cords and the lacunar system is unknown. The function of the lacunar system in the avian ovary has been extensively discussed (Cliffhault 1970), but no definitive conclusion has been proposed. However, both structures could be important because (i) they are the origin of part of the theca layer during follicular-

genesis, and (ii) are involved in the synthesis of steroid hormones.

The source of steroidogenic cells in the ovary of the chick embryo has been attributed to the primary medullary cords (Narbutz and Adler 1966; Stahl and Carion 1973; Jordanov et al. 1978). Therefore, the three cell populations are linked by a similar origin. The fact that epithelial cells of the ovarian medulla presented signs of stimulation after hCG-treatment strengthens the relationships between these cell populations.

**Acknowledgments.** The authors wish to thank to Dr. R. Narbutz for helpful discussions and comments and Mr. Tomas Cruz Mendez for help in photographic techniques. This work was supported in part by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) (NA-050284).

## References

- Blanchette J.H. (1966) Ovarian steroid cells II. The lutein cell. *J. Cell Biol.* 3: 517-542.
- Cliffhault M. (1970) The avian embryo is an open organ. *Anat. Embryol.* 158: 103-119.
- Christensen A.K. (1965) The fine structure of testicular interstitial cells in guinea pig. *J. Cell Biol.* 26: 911-935.
- Dahl E. (1971) Studies of the fine structure of ovarian interstitial tissue. 3. Effects of gonadotropins on the theca gland of domestic fowl. *Z. Zellforsch.* 113: 133-156.
- Ferker Z. (1974) Recherches sur l'organogenèse des glandes sexuelles chez les oiseaux. *Arch. Biol. Paris* 29: 201-251.
- Gaál E., E. Wasserman (1973) Steroid biosynthesis by gonads of 7- and 10-day-old chick embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.* 21: 77-84.
- Gonzalez C.B., Charreau F.H., Lantos C.P., Aragonés A., Follet B.K. (1985) Parámetros hormonales hipofisario-gonadales en el embrión de pollo hembra. *Medicina* 45: 418.
- Gonzalez-Moran U., Gonzalez de Piore G.M., Pedernera E. (1985) Morphological changes in the ovary of newly hatched chickens treated with chorionic gonadotropin during embryonic development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 66: 162-167.
- Cliffhault A., Cedard J., Hatten K.P. (1973) Aspect comparatif de la synthèse de stéroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de poulet à différents stades du développement: étude en culture organotypique à partir de précurseurs radioactifs. *Gen. Comp. Endocrinol.* 20: 11-25.
- Cliffhault A., Hatten K.P., Cedard J., Mignot Th.M., Scheib D. (1979) Effects of hCG and of season on *in vitro* steroidogenesis by 18-day chick embryo gonads. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 19: 1317-1325.
- Hatten K., Cedard J. (1968) Etude en culture organotypique *in vitro* du métabolisme de la dehydroépiandrosterone et de la testostérone radioactives par les gonades normales et intersexuelles de l'embryon de poulet. *Gen. Comp. Endocrinol.* 11: 226-234.
- Jordanov J., Angelova P., Boyadzieva-Michailova A., Bakarska M.

Fig. 4. Steroidogenic cells in the ovary of the newly hatched chick treated with hCG. Note increment of smooth endoplasmic reticulum (S), mitochondria (M) with tubular cristae and lipid droplets (L). Steroidogenic cells are separated by a basal lamina (BL) from another epithelial cell cluster. *G* Golgi complex; *R* rough endoplasmic reticulum; *M* mitochondria. Note desmosomes (arrow). The cytoplasm of an oocyte (O) is partially observed between the epithelial cells.  $\times 12,000$ .

Fig. 5. Poorly differentiated cell in the ovarian medulla of the hCG-treated group. Continuous basal lamina (BL) and cavity (C) between the cells. *R* Rough endoplasmic reticulum; *M* mitochondria; abundant polyribosomes (P). Nucleus with a prominent nucleolus.  $\times 23,000$ .

Fig. 6. A group of epithelial cells in the ovary of the hCG-treated chicken. *S* smooth endoplasmic reticulum; *L* lipid droplets; *M* mitochondria; *R* rough endoplasmic reticulum. The epithelial cell cluster is surrounded by a basal lamina (BL).  $\times 11,000$ .

Fig. 7. Epithelial cell islet delimited by a basal lamina (BL) with a small cavity (C) in the ovary of the hCG-treated group. *G* Golgi complex; *S* smooth endoplasmic reticulum; *M* mitochondria with tubular cristae; *L* lipid droplets.  $\times 10,000$ .

- (1978) Ultrastructure of developing interstitial cells in chick embryonic gonad in relation to their genesis and steroidogenic function. *Z Mikrosk Anat Forsch* 92: 449-463
- Mori H, Christensen K (1980) Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J Cell Biol* 84: 340-354
- Narbutz R, Adler R (1966) Submicroscopical observations on the differentiation of chick gonads. *J Embryol Exp Morphol* 16: 41-47
- Narbutz R, Kolodny L (1964)  $\Delta 5-3\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase in differentiating chick gonads. *Z Zellforsch* 59: 1-5
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-209
- Scherb D, Haffen K (1967) Etude histochimique de la  $3\beta$ -hydroxysteroïde deshydrogenase dans les jeunes gonades embryonnaires de poulet. *C R Acad Sci Ser D* 264: 161-164
- Stahl A, Carlton N (1973) Morphogenese des cordons sexuels et signification de la gonade chez l'embryon de poulet. *Acta Anat* 85: 248-274
- Teng CL, Teng CS (1977) Studies of sex organ development. The hormonal regulation of steroidogenesis and adenosine 3,5 cyclic monophosphate in embryonic chick ovary. *Biochem J* 162: 123-134
- Weinger JD, Zeis A (1971) Biosynthese d'oestrogenes par les etanches gonadiques de poulet. *Gen Comp Endocrinol* 16: 391-397
- Woods JE, Weeks RL (1969) Ontogenesis of the pituitary-gonadal axis in the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 13: 242-254
- Woods JE, Mennella JA, Thomas RC (1981) The hypothalamic-adenohypophysial-gonadal axes in the developing chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 45: 66-73
- Zirkin BR, Dykman DD, Kromann N, Cochran RC, Ewing LJ (1982) Inhibition and recovery of testosterone secretion in rats are tightly coupled to quantitative changes in Leydig cells smooth endoplasmic reticulum. *Ann NY Acad Sci* 383: 17-28

Accepted February 25, 1988

STEROIDOGENIC CELL SUBPOPULATIONS DERIVED FROM THE THECA OF  
PREOVULATORY FOLLICLES IN THE Ovary OF THE DOMESTIC FOWL.

Velázquez E., Gómez Y., González del Río G. M., Federnera E.\*  
Departamento de Histología y \*Departamento de Embriología,  
Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México,  
México, 04510 DF.

ABSTRACT

The purpose of the present study was to afford further evidences to the theory that two cells were involved in the secretion of estrogens and androgens in the theca of the preovulatory ovarian follicles in the domestic fowl. The third (F3), the fourth (F4) and the fifth (F5) largest follicles were obtained from white Leghorn hens. Theca cells were dispersed by trypsin treatment, and isolated cells were centrifuged in a continuous Percoll gradient (1-10%). The secretion of 17 $\beta$ -estradiol and testosterone by cell samples from each density gradient fraction were radioimmunoassayed. A higher density (1.05-1.07) of the theca cells secreting 17 $\beta$ -estradiol was registered, compared to the density of the cells producing testosterone (1.07-1.08). The difference was obtained in the three types of follicles studied (F3-F5). The morphological study of the F4 follicle was performed. Typical steroidogenic cells with abundant lipid droplets in the cytoplasm were found in the theca interna, whereas clusters of poorly differentiated epithelial cells were visualized between fibroblast layers of the theca externa. The secretion of aromatizable androgens by the typical steroidogenic cells of the theca interna and the estrogen production in the epithelial cells of the theca externa is postulated.

theca and granulosa cells of the follicle. The role of theca cells in developing follicles of the avian ovary has been investigated by androgens by the "theca assay" of the follicle. In this assay, the granulosa cells are incubated with androgens and androstenedione (Bormann et al., 1971; Inoue et al., 1972; Bormann et al., 1973; Armstrong, 1974; Bormann and Armstrong, 1974).

In the ovary of the domestic fowl, theca cells of theca follicles and estragens has been observed in the theca layer of the preovulatory follicles (Hoad and Hargrove, 1971; Hargrove and Hertelend, 1985), whereas, the granulosa cells of the same follicles are the main source of progesterone (Young et al., 1979; Hammond et al., 1981; Wells et al., 1981).

The possibility that two cell populations were involved in the secretion of androgens and estragens in the avian ovary has been previously considered. Evidence afforded by our laboratory working with the ovary of the newly hatched chicken, identified subpopulations in the steroid secreting cells. A pure population of typical steroidogenic cells presented 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity, and secreted testosterone. Nevertheless, anomalous activity and 17 $\alpha$ -estradiol secretion was registered in another subpopulation of relatively undifferentiated cells. Both cell subpopulations were located in the subcapsular medulla of the ovary in the newly hatched chicken (Fadernera et al., 1988).

In the same sense, a differential steroid production between theca interna and theca externa in the turkey hen ovary, suggested the participation of two cells in the secretion of estragens and androgens. Theca interna cells of the fifth largest follicle (F5) secreted testosterone and progesterone but not 17 $\alpha$ -estradiol, however, the production of 17 $\alpha$ -estradiol was detected when theca externa cells were incubated. Estradiol secretion was enhanced by the presence of theca interna cells or the addition of androstenedione or testosterone as precursors (Porter et al., 1987). Similar results were obtained with the preovulatory follicle (F5) in the ovary of the domestic fowl. When theca cells were dissociated by fractional trypsinization, cells from the theca interna were found, isolated, and these cells secreted testosterone, but 17 $\alpha$ -estradiol production was not detected. On the other hand, when the whole theca was disaggregated, 17 $\alpha$ -estradiol secretion was registered (Fadernera et al., 1987). In the present study, further evidences are afforded to support the theory that two cells types participate in the secretion of androgens and estragens in the theca folliculi of the avian ovary.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Ribbedco's modified Eagle's medium (MEM) and trypsin were obtained from Grand Island Biological Co. (Grand Island, NY); soybean trypsin inhibitor, bovine serum albumine (BSA), 1-methyl-3-isobutyl carbodiimide (MIB), benzodol, human chorionic gonadotropin

(NCE), testosterone and 17 $\beta$ -estradiol were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.; Anti-testosterone and anti-17 $\beta$ -estradiol sera were products from Calbiochem and Calbiochem, Inc.; 1,2,6,17-<sup>3</sup>H testosterone (105 Ci/mmol) and 1,2,6,17-<sup>3</sup>H estradiol (115 Ci/mmol) were purchased from NEN Dupont (Wilmington, DE).

#### Theca cell preparation.

Adult female week-old white Leghorn hens (Barnock B300) were obtained from the poultry farm of the veterinary school, National Autonomous University, of Mexico. The birds were maintained in individual cages, and the oviposition controlled. Animals were killed by cervical dislocation 48 hr after ovulation. The FS, F4 and F1, the fifth, fourth and third largest follicles were selected, theca layer was separated from granulosa (Gilbert et al., 1977), and released from the adhering connective tissue on the exterior of the follicle. The dissociation of theca was performed by incubating in 2.5  $\mu$ l of trypsin in balanced salt solution ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  free) at 37 C in a shaking bath (90 cycles/min).

Theca cells dispersed after 30 min of trypsin treatment were filtered through a nylon mesh to eliminate tissue fragments, treated with 5.0  $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor in DMEM with 1.0  $\mu$ g/ml BSA, and washed with two changes of DMEM-BSA. Isolated theca cells (10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup>/ml cells) were laid on the top of 4.5 ml of continuous Percoll gradient (Gibco) and centrifuged at 150x g for 15 min, and 0.4 ml fractions were collected from the top of the centrifuge tube. Fractions containing theca cells were washed with 10 ml of DMEM-BSA. The final cell number was counted in each fraction with the aid of a hemocytometer, and viability was established by the trypan blue exclusion test (Leppard, 1969).

Samples for <sup>3</sup>H-ligand of the cell suspensions obtained from the fractions of the density gradient were incubated in 1 ml of DMEM-BSA with 0.1  $\mu$ M of MA and 1.0  $\mu$ M of <sup>3</sup>H. The cells were incubated for 12, 60 and 120 min at 37 C in a shaking bath (90 cycles/min), under 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. Aliquots (20  $\mu$ l) of the medium were collected; 17 $\beta$ -estradiol and testosterone were directly measured by specific radioimmunoassays that were previously validated (Figueroa and Gomez, 1984).

For morphological studies, fragments of the theca were fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde in 0.15 M phosphate buffer, pH 7.4, postfixed in 1% osmium tetroxide and embedded in plastic resin. Sections of 1  $\mu$ m thick were stained with toluidine blue for light microscope observations. Grey to pale gold sections were obtained with a Reichert ultramicrotome (Ruitdorf) and stained with uranyl acetate followed by lead citrate (Reynolds, 1963). The sections were observed in a EM10 Zeiss electron microscope.

#### DISCUSSION

The secretion of testosterone and testosterone 17 $\beta$  in the incubation media of the three types of follicles obtained from the densit. gradient is shown in Table 1. The amount of steroid hormones secreted was higher in antral follicles F1 and F4 than in F2 follicles. It should be noted that testosterone highest value was obtained in F4 follicle.

The distribution pattern in the densit. gradient of the cells secreting testosterone displayed a local value between 1.0-1.5 and 1.4-1.6 cm in the three types of follicles studied, whereas the secretion of testosterone was at the highest quantity in the cells collected at 1.55 and 1.70 cm in the directions of the gradient. The difference in the distribution between cells secreting testosterone and testosterone is observed in the three types of follicles.

In the ultrastructural study of the F4 follicle, a group of typical steroidogenic cells was observed in the inner interna (Fig. 2). These steroidogenic cells displayed abundant lipid droplets in the cytoplasm, mitochondria with tubular cristae and smooth endoplasmic reticulum. Besides cells secreting steroidogenic cells, fibroblast, capillary vessels and small nerve branches, were found in their interna (Fig. 2). These externa was formed by lamellar layer of fibroblast and collagen fibers and in superficial cells with abundant cytoplasm in the cytoplasm could be found at this location. Frequently, vacuoles of epithelial cells were observed between the fibroblast layer. These vacuoles are well separated in the periphery of the theca externa (Fig. 2). The vacuoles of epithelial cells are delimited by a single layer. These cells were characterized by a nucleus with a few laminae of heterochromatin, and the nucleolus was usually observed in the dorsal side of epithelial cells. Polyemes, a few rough endoplasmic reticulum, dispersed and mitochondria with lamellar cristae were identified. Such vesicles were not observed and lipid inclusions are occasionally found (Fig. 2).

#### DISCUSSION

Present results confirm previous findings (Hart et al., 1974; Marbone and Hartsfield, 1969) about the secretion of estrogens and androgens by the theca cells in the absence of granulosa cells or endogenous androgen. Therefore, the high steroidogenic capability of the antral follicle is also in agreement with others reports (Marbone and Hartsfield, 1969; Hart et al., 1974; Armstrong, 1965).

The difference observed between the densit. act. of the testosterone secretion cells and the cells producing 17 $\beta$  testosterone could be explained by the fact that the cells secreting these internal cells supported in a rate testosterone (Foster et al., 1969; Marbone et al., 1970) which had also high lipid droplets in the cytoplasm and not found in low densit. level.

in the gradient. Cells secreting 17 $\beta$ -estradiol should be found in the theca externa (Barton et al., 1978). The candidates for 17 $\beta$ -estradiol production are the cells of the theca externa and relatively undifferentiated granulosa cells which are situated in the theca externa of smaller antral follicles. Lipid droplets are almost absent in this cell type compared to steroidogenic cells. Then, a higher density in the 17 $\beta$ -estradiol secreting cells is expected, as it was observed in results.

The presence of two different cell types with steroidogenic capabilities in the theca of preovulatory follicles in the domestic fowl could be postulated. Following this paradigm, the two cell subpopulations identified in the ovary of the newly hatched chicken (Bedemera et al., 1988) would be found in the theca interna and externa of the adult ovary. Immunocytochemical studies would be necessary to obtain additional evidences about the location of steroidogenic cell subpopulations in the theca of the preovulatory follicles in the adult ovary.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported in part by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PUD800UX-891524).

#### REFERENCES

- Armstrong, D. G. (1984). Ovarian aromatase activity in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J. Endocr.* **100**, 81-86.
- Bahr, J. M., Wang, S.-C., Huang, M. Y., and Galvo, F. U. (1983). Steroid concentration in isolated theca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen. *Biol. Reprod.* **29**, 1269-1274.
- Dorrington, J. H., Moor, R. B., and Armstrong, D. G. (1975). Estradiol-17 $\beta$  biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats: stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* **97**, 115-121.
- Ericsson, G. E., and Hsueh, R. J. W. (1973). Stimulation of aromatase activity by follicle-stimulating hormone in rat granulosa cells "in vivo" and "in vitro". *Endocrinology* **93**, 1255-1262.
- Fortune, J. E., and Armstrong, D. G. (1978). Androgen production by theca and granulosa isolated from preovulatory follicles. *Endocrinology* **103**, 1241-1247.
- Gilbert, A. E., Evans, R. J., Perry, R. M., and Davidson, 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**, 129-131.
- Hammond, R. W., Todd, H., and Hertzfeldt, E. (1980). Effect of mammalian gonadotropins on progesterone release and cyclic nucleotide production by isolated avian granulosa cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* **41**, 46-51.
- Huang, S.-C., Bahr, and Galvo, F. U. (1983). Steroidogenesis of chicken granulosa cells and theca cells in vitro: incubation system. *Biol. Reprod.* **29**, 127-130.

- Huang, S. H., Li, T. H. F., and Hsueh, R. W. (1979). Synthesis of sex steroids by different components of chicken follicles. *Biol. Reprod.* **20**, 464-481.
- Mekris, A., Ryan, R. J., and Eppolsterone, androstenedione, testosterone, estrone, and estradiol synthesis in hamster ovarian follicle cells. *Endocrinology* **95**, 674-701.
- Marrone, B. L., and Hentelendy, E. (1973). Steroidogenesis by avian ovarian cells: effects of lutealizing hormone and substrate availability. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **244** (Endocrinol. Metab. 2), 448-491.
- Marrone, B. L., and Hentelendy, E. (1985). Decreased androstenedione production with increased follicular maturation in theca cells from the domestic hen (*Gallus domesticus*). *J. Reprod. Fert.* **4**, 543-550.
- Pedernera, E., and Gomez, F. (1984). Effect of the response to chorionic gonadotropin in the chick embryo testis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**, 244-247.
- Pedernera, E., Gomez, F., Velazquez, F., Balsechuropeza, M. A., and Gonzalez del Fieco, M. (1987). Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. *Gen. Comp. Endocrinol.* **71**, 127-132.
- Pedernera, E., Velazquez, F., Gomez, F., and Gonzalez del Fieco, M. (1989). Isolation of steroidogenic cell subpopulations in the follicular theca of the ovary in the domestic fowl. In "Growth Factors and the Ovary," (R. N. Hirshfield, ed.), pp. 351-355. Plenum Press, New York.
- Porter, J. E., Haruta, E. M., Stisby, J. L., and El Hakiawani, M. E. (1989). Differential steroid production between theca interna and theca externa cells: A three-cell model for follicular steroidogenesis in avian species. *Endocrinology* **125**, 1073-16.
- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 157-162.
- Tennant, J. R. (1964). Evaluation of the trypan blue technique for the determination of cell viability. *Transplantation* **9**, 503-504.
- Wells, J. W., Dick, H. F., and Gilbert, W. B. (1981). The biosynthesis of progesterone by fowl granulosa cells in vitro from <sup>14</sup>C-labelled substrates. *J. Steroid Biochem.* **14**, 651-656.

#### LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Testosterone and 17 $\alpha$ -estradiol secretion by theca cells of the F5 (▲), F1 (■) and F1 (○) preculatory ovarian follicles. Cell samples were obtained from the Percoll density gradient. Each point represents the mean of 4 follicles from two separate experiments. Bars indicate SEM.

Figure 2. Section through a 14 preculatory ovarian follicle showing granulosa cells (G), the basal membrane (BM) and the theca layer. Theca interna (TI) displays steroidogenic cells (arrows) and theca externa (TE) displays relatively undifferentiated cells (arrowheads) as observed in the theca

externa (TE). Bar represents 10  $\mu$ m.

Figure 3. A) Electron micrograph of typical steroidogenic cells localized in the theca interna of a 24 preovulatory ovarian follicle. Lipid droplets (LD) and mitochondria with tubular cristae (M) are abundant in the cytoplasm. Smooth endoplasmic reticulum (SE) could be identified. Bar represents 1  $\mu$ m.

B) Ultrastructure of relatively undifferentiated epithelial cells from the theca externa. A basal lamina (BL) is observed surrounding the cell clusters. Rough endoplasmic reticulum and polysomes are observed in the cytoplasm. Mitochondria with lamellar cristae are identified. Bar represents 1  $\mu$ m.

17B - ESTRADIOL (ng/10<sup>6</sup> cells/2h) TESTOSTERONE (ng/10<sup>6</sup> cells/2h)

