

00346  
2'eye.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD ESTEROIDOGENICA  
EN DIFERENTES POBLACIONES CELULARES DEL OVARIO  
DE POLLO RECIEN NACIDO.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A :  
BIOL. GEORGINA ALVAREZ FERNANDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MARCO ANTONIO JUAREZ OROPEZA



MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON  
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.

Esta Tesis fue realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la tutoría del Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza y la cotutoría del Dr. Enrique Pedernera Astegiano. El trabajo fue financiado parcialmente por la DGAPA, UNAM (IN212691).

## AGRADECIMIENTOS

A los miembros que forman parte de mi jurado:

Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza  
Dr. Enrique Pedernera Astegiano  
Dr. Gerardo Hebert Vázquez Nin  
Dr. Luis Felipe Jiménez García  
Dr. Guillermo Mendoza Hernández  
Dr. René Cárdenas Vázquez  
Dr. Pedro Nicolás Velázquez

por la cuidadosa revisión del manuscrito y las útiles aportaciones que permitieron mejorar este trabajo.

Al Dr. Luis Felipe Montaña Estrada, por sus valiosos comentarios.

A la Dra. Margarita González del Pliego por el procesamiento del material para microscopía electrónica.

Al Dr. Raúl Ulloa Arvizu por su ayuda en el análisis estadístico de los datos.

Al Sr. Tomás Cruz Méndez por el trabajo fotográfico.

**A LA MEMORIA  
DE MI PADRE Y DE MI HERMANO ALEJANDRO**

Cuyo grato recuerdo me acompaña siempre.

**A MI MADRE Y A MIS HERMANOS  
ROBERTO Y MIGUEL ANGEL**

Con todo mi cariño y gratitud  
por compartir mis planes.

**A ERNESTO Y A REBECA**

Porque su apoyo constante y  
profundo cariño, siempre han  
sido el principal estímulo para  
la realización de mis proyectos.

**A HUGO, SANDRA Y LAURA**

Con profundo cariño.

**A MIS AMIGOS**

Por todos los momentos,  
proyectos y sinsabores  
compartidos.

**A MIS COMPAÑEROS DE  
BIOQUIMICA**

Cuya solidaridad y apoyo  
cotidianos, han generado  
para mí un grato ambiente  
de trabajo.

## RESUMEN

Se estudió la capacidad para metabolizar progestágenos y andrógenos de diferentes poblaciones celulares del ovario de pollo recién nacido. Asimismo, se observó si existía alguna correlación entre las características morfológicas y las capacidades esteroidogénicas de dichas poblaciones celulares. Las células se obtuvieron disgregando con tripsina durante 30 minutos el ovario funcional (izquierdo) y la separación de las poblaciones celulares se efectuó por medio de dos gradientes subsecuentes de metrizamida (0-15%). Posteriormente, las fracciones celulares aisladas por este procedimiento se procesaron para microscopía electrónica o fueron estudiadas en su capacidad para metabolizar los siguientes esteroides tritiados: pregnenolona, progesterona, dehidroepiandrosterona, androstendiona y testosterona. Los metabolitos obtenidos, sirvieron como indicadores de la presencia de cada uno de los diferentes complejos enzimáticos involucrados en la transformación desde progestágenos hasta estrógenos, en cada una de las poblaciones celulares. Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionaron evidencias de que en el ovario de pollo recién nacido: 1) Las células Fracción 1 [densidad (d)= 1.026 gr/ml], identificadas como células esteroidogénicas típicas por su ultraestructura, presentaban actividad de las enzimas  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/  $\Delta^4$  isomerasa y C17-20 liasa, siendo capaces de transformar progestágenos hasta andrógenos. 2) Las células germinales de la F2 (d= 1.048 g/ml), que en su mayoría se encontraban en estadio de ovocitos primarios, probablemente no participan de manera significativa en la esteroidogénesis ovárica. 3) Las fracciones F3 (d= 1.059 gr/ml) y F4 (d= 1.071 gr/ml) eran poblaciones mixtas, constituidas a su vez por tres subpoblaciones celulares, identificadas por sus características ultraestructurales como células poco diferenciadas, pregranulosas y fibroblastos. Ambas fracciones celulares presentaron actividad de  $5\beta$ -reductasa y de aromatasa, mientras que la actividad de  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD), se localizó principalmente en F3, sugiriendo, que dentro de las células poco diferenciadas existen dos subpoblaciones, una de las cuales exhibe la actividad de  $17\beta$ -HSD, mientras que la otra presenta actividad de aromatasa y de  $5\beta$ -reductasa. Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir que, en el ovario de pollo recién nacido, existen por lo menos dos o probablemente tres subpoblaciones celulares con distintas capacidades metabólicas, involucradas en la esteroidogénesis.

## INDICE

	Página.
1. INTRODUCCION .....	1
Las Hormonas Ováricas.....	2
Síntesis y Metabolismo de las Hormonas Esteroides..	8
Morfogénesis del Ovario en las Aves .....	17
Panorama General de la esteroidogénesis ovárica en las Aves .....	21
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	27
3. OBJETIVOS .....	29
4. MATERIAL Y METODOS .....	30
5. RESULTADOS .....	36
6. DISCUSION Y CONCLUSIONES .....	47
7. REFERENCIAS .....	58
8. APENDICE .....	64

## INTRODUCCION

Una de las funciones más importantes del ovario y del testículo, además de la formación de gametos, es la producción de hormonas sexuales. Estas a su vez, juegan un papel fundamental en la diferenciación y maduración de los gametos, el desarrollo del aparato reproductor y el establecimiento de los caracteres sexuales secundarios.

En el ovario, los folículos son las principales unidades funcionales. Cada uno de ellos proporciona un sistema de apoyo para que el ovocito pueda alcanzar la madurez, de tal manera que al unirse con el espermatozoide, genere un embrión capaz de desarrollarse en su totalidad, conduciendo al nacimiento de un producto normal.

Las células somáticas del folículo contribuyen de diferente forma en la función folicular. En primer término, le proporcionan al ovocito las sustancias nutritivas necesarias para su crecimiento. Posteriormente, controlan la maduración del mismo, preparándolo para la ovulación o participando en el proceso de atresia y destrucción del ovocito, mediante cambios en el microambiente interno del folículo, mediados en gran parte por productos de secreción de las células foliculares.

Los productos de secreción del folículo más conocidos y mejor caracterizados son las hormonas esteroides. Estas moléculas pueden funcionar como hormonas en el sentido "clásico", siendo transportadas por medio de la circulación a diferentes tejidos y órganos

blanco, que forman parte no solo del aparato reproductor, sino también del sistema nervioso central, el sistema músculo esquelético, el sistema cardiovascular y el sistema inmune, así como el hígado o los tejidos adiposo y cutáneo (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

Por otra parte, los esteroides ováricos también pueden actuar localmente dentro de los folículos que los sintetizan, como moduladores parácrinos en las células adyacentes o como agentes autócrinos dentro de las células que los producen (Chafkin y cols., 1992).

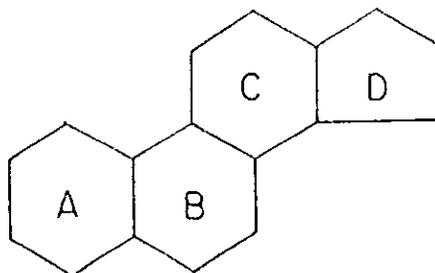
## **LAS HORMONAS OVARICAS.**

### **Estructura química.**

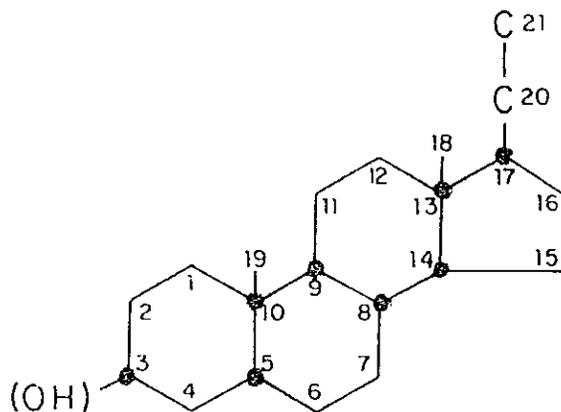
La estructura común de todas las hormonas esteroides es la del núcleo químico básico del ciclopentanoperhidrofenantreno o núcleo esteroide. Este es un hidrocarburo cíclico constituido por 17 átomos de carbono, dispuestos en 3 anillos de seis átomos de carbono totalmente saturados (perhidrofenantreno), que se denominan A, B y C y, un anillo de 5 átomos de carbono (ciclopentano), que corresponde al anillo D. Pueden agregarse carbonos adicionales en las posiciones 10 y 13 o como una cadena lateral, unida al carbono 17 (Fig. 1) (Granner, 1992).

Tanto las hormonas esteroideas, como sus precursores y metabolitos difieren en el número y tipo de grupos sustituibles, en el número y localización de las dobles ligaduras y en la configuración estereoquímica.

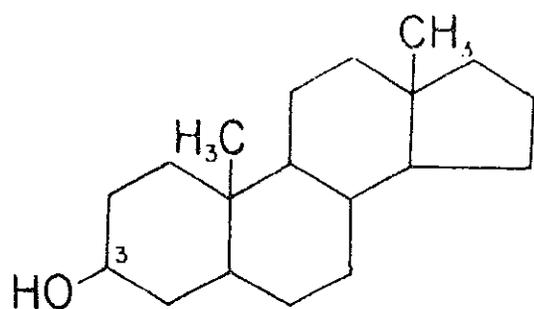
Los carbonos asimétricos, permiten el estereoisomerismo. Los



Núcleo del  
ciclopentano  
perhidrofenantreno

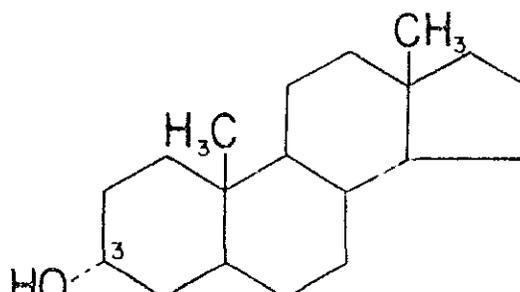


**Figura 1.** Características estructurales de las hormonas esteroideas. Estructura química del ciclopentanoperhidrofenantreno, núcleo básico de las hormonas esteroideas, constituido por 17 carbonos que forman 4 anillos designados de la A a la D. Se señalan las posiciones de los carbonos asimétricos (Modificada de la referencia 19).



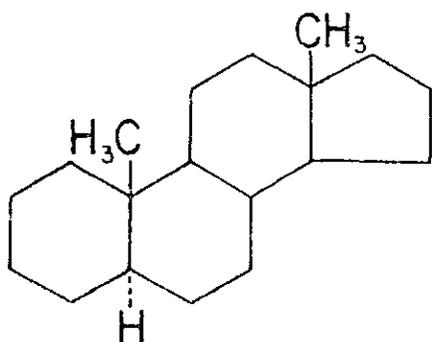
El grupo hidroxilo  
está por encima ( $\beta$ )

3  $\beta$ -Hidroxi

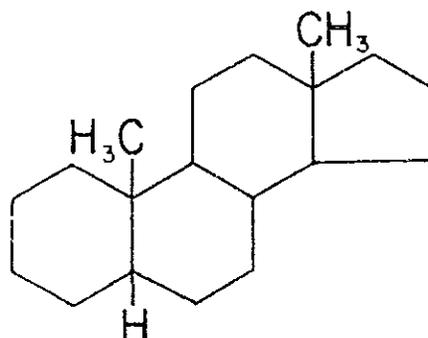


El grupo hidroxilo  
está por debajo ( $\alpha$ )

3  $\alpha$ -Hidroxi



5  $\alpha$ -Hidrógeno  
(una fusión trans)



5  $\beta$ -Hidrógeno  
(una fusión cis)

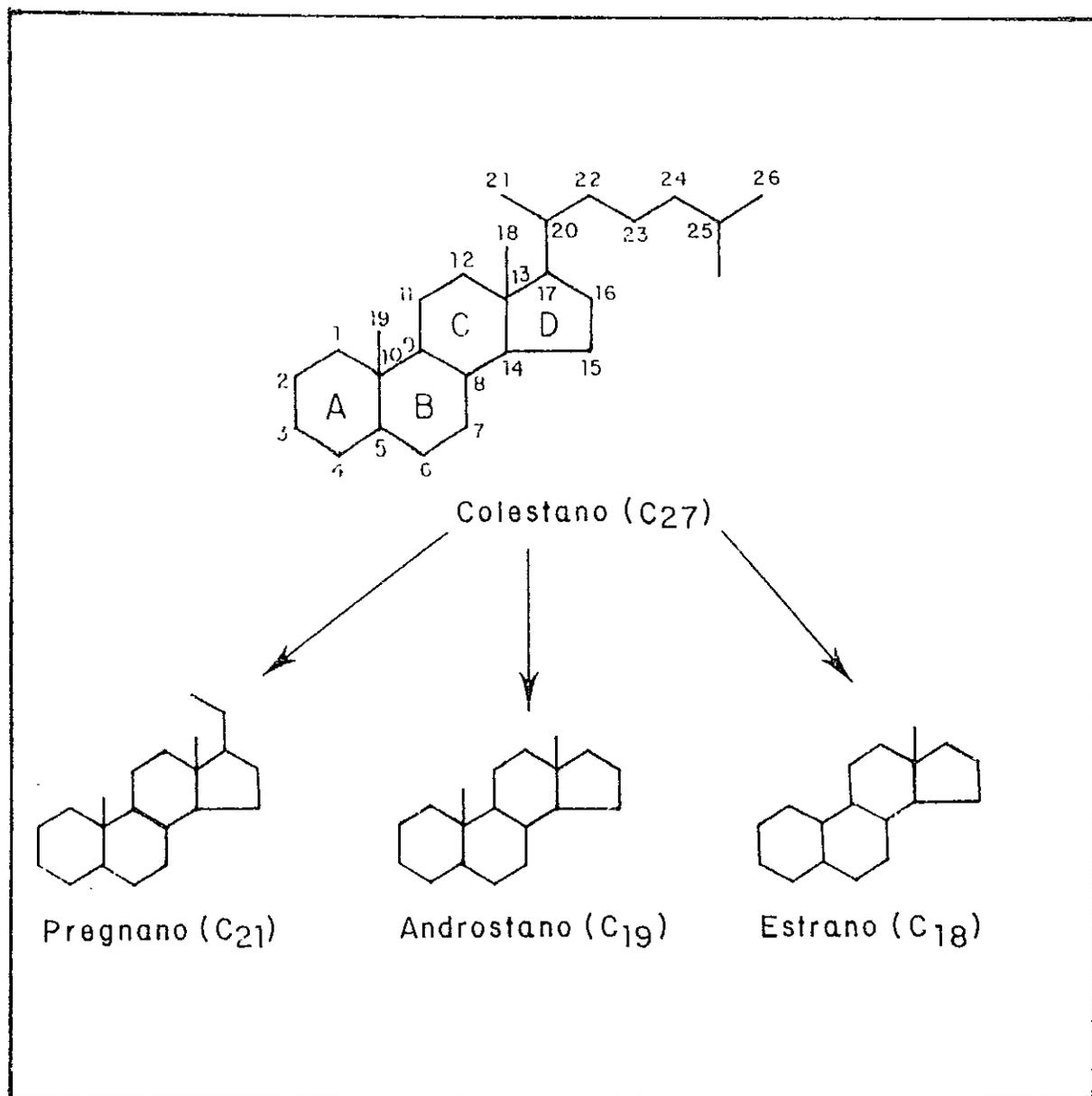
**Figura 2.** Estereoisomería de los carbonos 3 y 5 en el ciclo-pentanoperhidrofenantreno. A) Sustituyente situado por encima del plano ( $\beta$ ) o proyectado por debajo del plano ( $\alpha$ ). B) Si el átomo de hidrógeno del C5 se encuentra orientado en  $\alpha$ , los anillos A y B se fusionan en una conformación trans; mientras que si está orientado en  $\beta$ , origina una conformación cis (Modificada de la referencia 66).

grupos metilo angulares (C19 y C18) en las posiciones 10 y 13, se proyectan hacia el frente del sistema de anillos y se utilizan como punto de referencia. Cuando los sustituyentes están situados por encima del plano, se dice que están orientados en beta ( $\beta$ ) y se indican con un trazo continuo. Por el contrario, si se proyectan por debajo del plano, se dice que están orientados en alfa ( $\alpha$ ) y se representan con un trazo discontinuo o líneas punteadas (Fig. 2).

El átomo de hidrógeno unido al C5 también puede estar orientado en  $\alpha$  o  $\beta$ . En el primer caso, los anillos se fusionan en una conformación *trans*, mientras que una orientación  $\beta$  origina una conformación *cis* (fig. 2).

La posición de los dobles enlaces se designa mediante el número del carbono que los antecede (ej.  $\Delta^5$  y  $\Delta^4$ ).

Todos los esteroides ováricos pueden considerarse como derivados químicos de alguno de los siguientes hidrocarburos básicos: a) colestano ( $C_{27}$ ), constituido por 27 átomos de carbono, a cuya estructura química básica pertenece el colesterol, que es la molécula precursora de las hormonas esteroides; b) el pregnano ( $C_{21}$ ), formado por 21 átomos de carbono, característico de las hormonas esteroides con actividad progestacional; el androstano ( $C_{19}$ ), que contiene 19 átomos de carbono y constituye la estructura química básica de las hormonas esteroides con actividad androgénica; y d) el estrano ( $C_{18}$ ), cuya estructura química corresponde a los esteroides con actividad estrogénica (Fig. 3) (Loza y cols., 1988).



**Figura 3.** Hidrocarburos básicos de los que se derivan los esteroides ováricos. El subíndice indica el número de átomos de carbono de cada núcleo esteroideo (Modificada de la referencia 18).

## **Clasificación Biológica.**

Los esteroides ováricos también se clasifican de acuerdo a su función biológica primordial en: progestinas, andrógenos y estrógenos.

### **Progestinas.**

La progestina más importante que produce el folículo es la pregnenolona (3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona), debido a que juega un papel clave como precursor de todas las hormonas esteroides y el metabolito C<sub>21</sub>, mas abundante es la progesterona (4-pregnen-3,20-diona), que es un intermediario biosintético producido por el folículo en todos los estadios de crecimiento y desarrollo y como producto final de secreción en los periodos peri- y postovulatorios. Por otra parte, la progesterona es la hormona responsable de la preparación morfofuncional del endometrio para la nidación del huevo fertilizado, el mantenimiento de la gestación y el desarrollo alveolar de la glándula mamaria en los mamíferos. Además, en forma conjunta con los estrógenos modula un número importante de efectos primordiales en el sistema nervioso central y en órganos periféricos durante la vida reproductiva (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

### **Andrógenos.**

Los principales andrógenos sintetizados en el ovario, son la dehidroepiandrosterona (3 $\beta$ -hidroxi-5-androsten-17-ona), la androstendiona (4-androsten-3,17-diona) y la testosterona (17 $\beta$ -hidroxi-4-androsten-3-ona) y se producen generalmente como intermediarios en la síntesis de estrógenos. También se han identificado algunos es-

teroides  $C_{19}$ , no aromatizables, formados por la saturación del anillo A del núcleo esteroide, entre los que se encuentran los andrógenos ováricos  $5\alpha$ -reducidos como la  $5\alpha$ -dihidrotestosterona, la  $5\alpha$ -androstan-3,17-diona, la androsterona y la epiandrosterona, así como el  $5\alpha$ -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol y su epímero  $3\beta$ . Además, se ha reportado la síntesis de andrógenos  $5\beta$ -reducidos en el ovario del hámster (Tsuji y cols., 1982) y de varias especies de aves (Sugimoto y cols. 1990).

### **Estrógenos.**

La estrona y el  $17\beta$ -estradiol producidos por el folículo ovárico, son los estrógenos más importantes desde el punto de vista fisiológico. Sus nombres triviales reflejan el papel que juegan en la inducción de la receptividad sexual (estro) en las hembras de los mamíferos y son los responsables de la expresión del fenotipo femenino en la etapa pospuberal al estimular el desarrollo de las estructuras sexuales secundarias. Además, en forma conjunta con la progesterona, aseguran la función gametogénica del ovario, lo cual les confiere un papel esencial en la función reproductora. El  $17\beta$ -estradiol es el más activo de todos los esteroides producidos en el ovario y, en la mayoría de los ensayos biológicos, es diez veces más potente que la estrona (Gore-Langton y Armstrong, 1988; Loza y cols., 1988).

### **SÍNTESIS Y METABOLISMO DE LAS HORMONAS ESTEROIDES.**

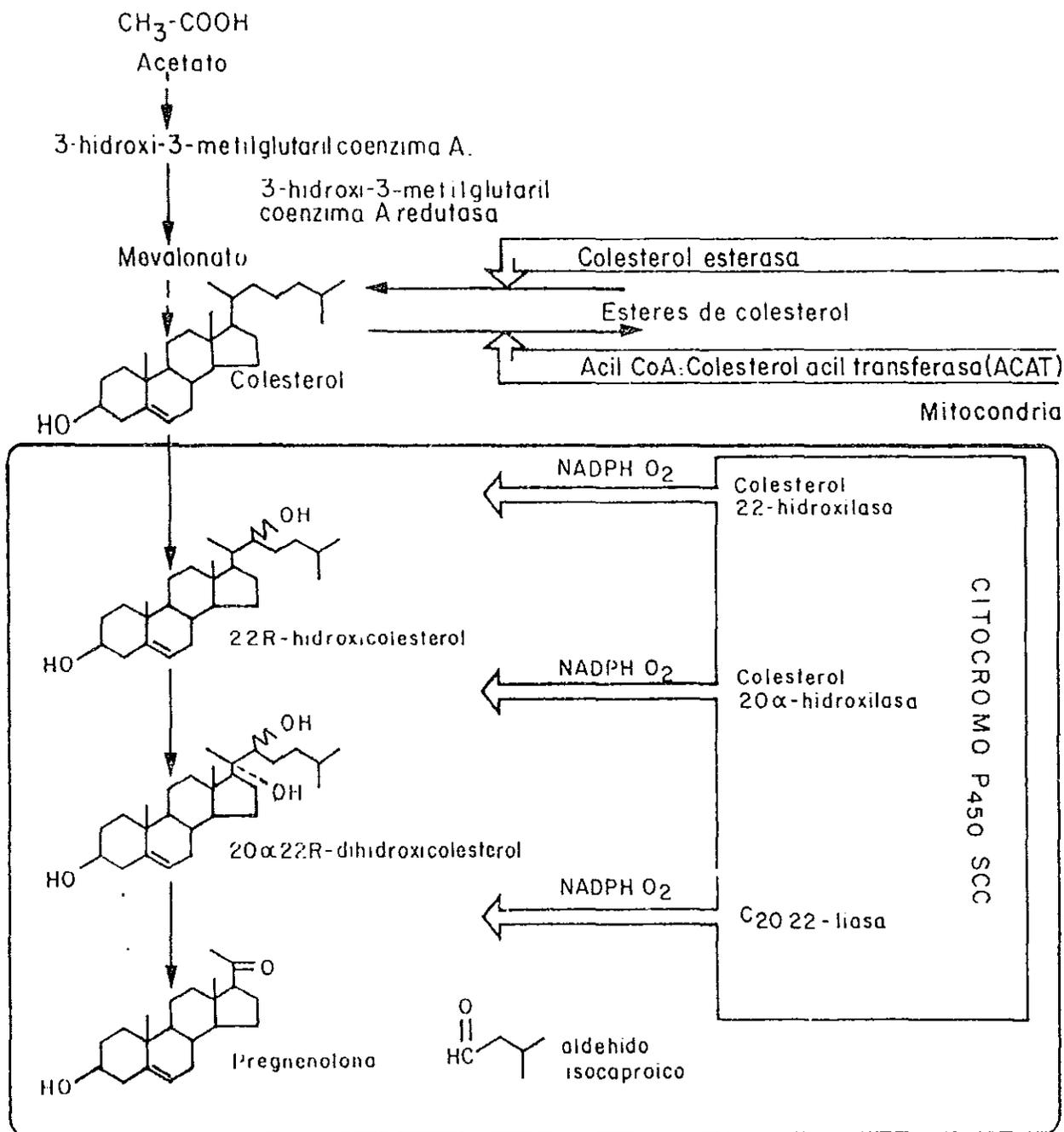
La síntesis de las hormonas esteroides se inicia a partir del colesterol. Las células ováricas, involucradas en esta función,

pueden obtener este precursor de tres fuentes importantes: a) el colesterol transportado por la sangre en forma de lipoproteínas circulantes; b) el colesterol almacenado dentro de la célula ovárica en su forma libre, como constituyente de las membranas celulares o proveniente de la hidrólisis de los ésteres de colesterol almacenados en gotas lipídicas dentro de la célula y, c) el colesterol sintetizado *de novo* a partir de acetato vía mevalonato. El grado de participación de cada una de las fuentes de colesterol en la esteroidogénesis ovárica varía con la especie animal y con el tipo de célula involucrada.

**Biosíntesis de Progestinas.  
Ruptura de la cadena lateral del colesterol.**

Las hormonas esteroideas tienen como máximo 21 átomos de carbono, mientras que el colesterol tiene 27, por lo que la primera etapa en la síntesis de estas hormonas es la ruptura del enlace covalente entre las posiciones C20 y C22 del colesterol, por medio de tres monooxigenaciones sucesivas, con la consecuente formación de pregnenolona (compuesto de 21 átomos de carbono) y un fragmento de seis átomos de carbono, el aldehído isocaproico.

El complejo multienzimático que cataliza esta reacción se localiza en la cara interior de la membrana interna mitocondrial y consta de tres componentes: el citocromo P450<sub>scc</sub> (side-chain cleavage), que es una oxigenasa terminal (aceptora de electrones), una flavoproteína dependiente de NADPH y la ferrosulfoproteína luteodoxina, que sirve para transportar un electrón entre los otros



**Figura 4.** Vía de síntesis de la pregnenolona, a partir del colesterol sintetizado *de novo* o derivado de fuentes existentes. Se ilustra el mecanismo de ruptura de la cadena lateral del colesterol, en la mitocondria, por medio de tres monooxigenaciones sucesivas, catalizadas por el complejo multienzimático del citocromo P450<sub>SCC</sub> (Modificada de la referencia 18).

dos componentes. Este sistema enzimático requiere de NADPH, oxígeno y colesterol para que se pueda llevar a cabo la reacción (Fig. 4).

La ruptura de la cadena lateral del colesterol es un paso limitante para la formación de pregnenolona y, por lo tanto, de las hormonas esteroides. En el ovario y en el testículo, es activado por la acción de la hormona luteinizante (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

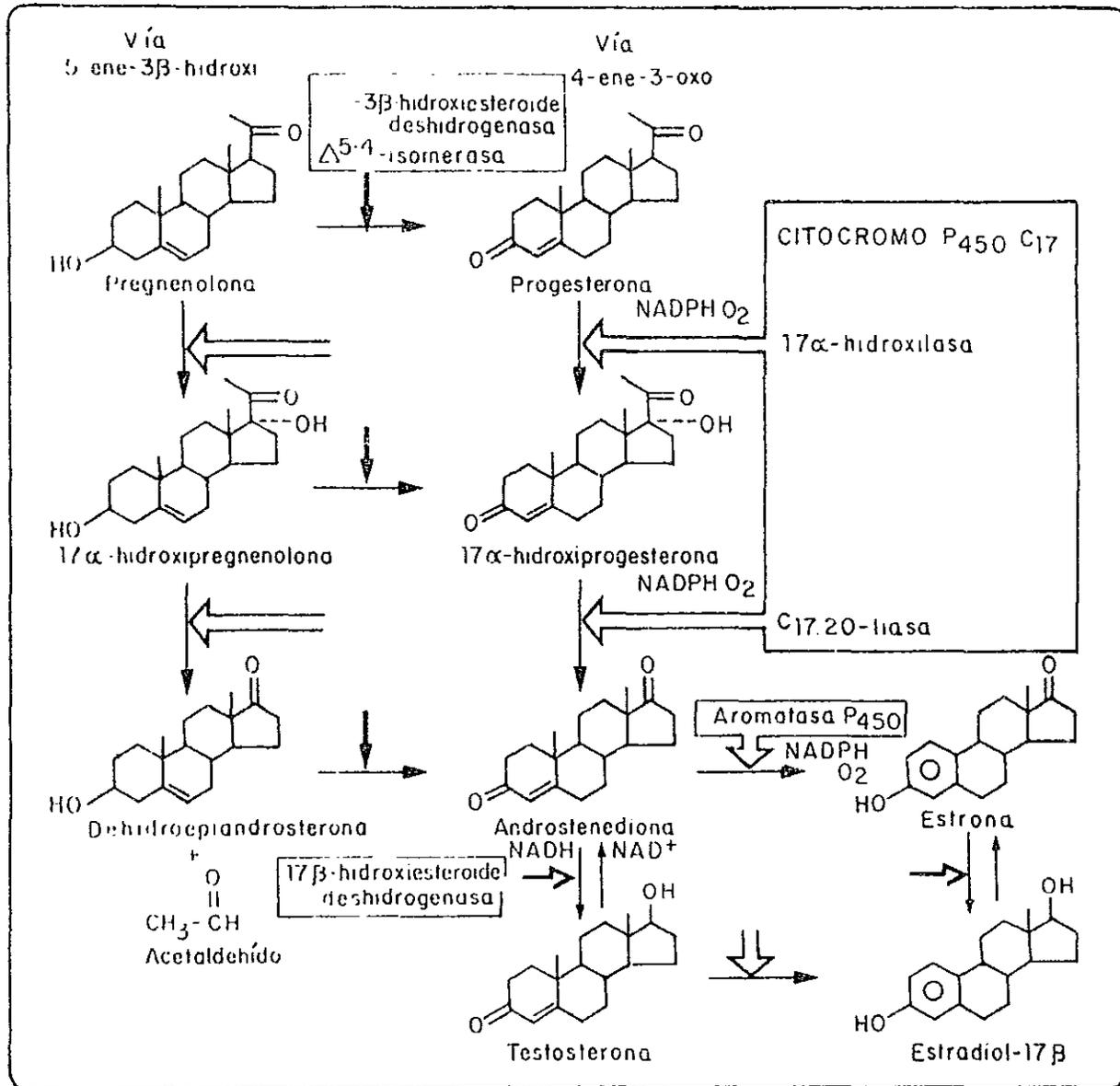
### **3 $\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta^{5,4}$ Isomerasa (3 $\beta$ -HSD).**

La conversión de pregnenolona en progesterona se efectúa mediante una reacción catalizada por la 3 $\beta$ -HSD, cuya actividad se localiza en la fracción microsomal. Este complejo enzimático presenta dos actividades catalíticas principales (deshidrogenasa e isomerasa) que, en conjunto, son las responsables de la transformación de los esteroides 3 $\beta$ -hidroxi-5-ene en 3-oxo-4-ene. Además, utiliza NAD<sup>+</sup> como aceptor de electrones y la reacción es esencialmente irreversible en condiciones fisiológicas (Fig. 5).

### **Biosíntesis de Andrógenos.**

#### **Ruptura de la cadena lateral de los esteroides C<sub>21</sub>.**

Los tejidos endócrinos que sintetizan andrógenos, utilizan tanto a la pregnenolona como a la progesterona como precursores para la formación de androstendiona y testosterona, que son los andrógenos más importantes. La escisión de la cadena lateral de los esteroides C<sub>21</sub>, es el paso limitante de la velocidad de síntesis de los andrógenos (C<sub>19</sub>). Este proceso bioquímico está catalizado por



**Figura 5.** Metabolismo de la Pregnenolona para la formación final de estrógenos (C<sub>18</sub>). Se representan los diferentes complejos enzimáticos involucrados, los intermediarios y las vías alternativas (Δ<sup>4</sup> y Δ<sup>5</sup>) para la síntesis de estrógenos en el ovario .

el complejo enzimático  $17\alpha$ -hidroxilasa/ C17-C20 liasa que contiene citocromo P-450<sub>C17</sub>, requiere NADPH y oxígeno molecular para su función y se localiza en las membranas de retículo endoplásmico liso. La hidroxilación del carbono 17 de la pregnenolona o de la progesterona es el primer paso para la ruptura de la cadena lateral y es catalizado por la  $17\alpha$ -hidroxilasa, dando lugar a la formación de  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona o  $17\alpha$ -hidroxiprogesteroa respectivamente. La ruptura de la unión entre los átomos de carbono 17 y 20 se efectúa posteriormente por la acción de la C17-C20 liasa (Fig. 5).

La biosíntesis de andrógenos puede efectuarse por dos vías alternativas: la vía de los  $\Delta^5$ , cuando el sustrato utilizado es la pregnenolona o la vía de los  $\Delta^4$  en el caso de que la progesterona se utilice como precursor. Los productos resultantes serán la dehidroepiandrosterona o la androstenediona respectivamente y el predominio de una de estas vías depende de la especie.

**Metabolismo reductor de los Esteroides ováricos.  
 $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD).**

La  $17\beta$ -HSD también cataliza la interconversión de los esteroides  $17$ -hidroxi y  $17$ -oxo y se han encontrado varias isoenzimas con especificidad por los andrógenos o los estrógenos (Hanukoglu, 1993). Esta enzima, se encuentra presente en los microsomas de diversos tejidos esteroidogénicos incluyendo al folículo y requiere de NAD(H) o NADP(H) como cofactor. La reacción puede ser reversible y la dirección de la misma depende de la disponibilidad de sustrato y de cofactor. La formación de testosterona puede llevarse a cabo

directamente a partir de la androstendiona (vía de los  $\Delta^4$ ) por la reducción del grupo cetónico del C17 de esta última, en una reacción catalizada por la 17 $\beta$ -HSD. En el caso de que la síntesis de testosterona se efectúe por la vía de los  $\Delta^5$ , la DHEA puede transformarse en androstendiona o ser reducida a androstenediol por acción de la 17 $\beta$ -HSD. Este último es convertido después en testosterona por acción de la 3 $\beta$ -HSD (Fig 5).

### **Vías para la 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -Reducción en el metabolismo de Progestinas y Andrógenos.**

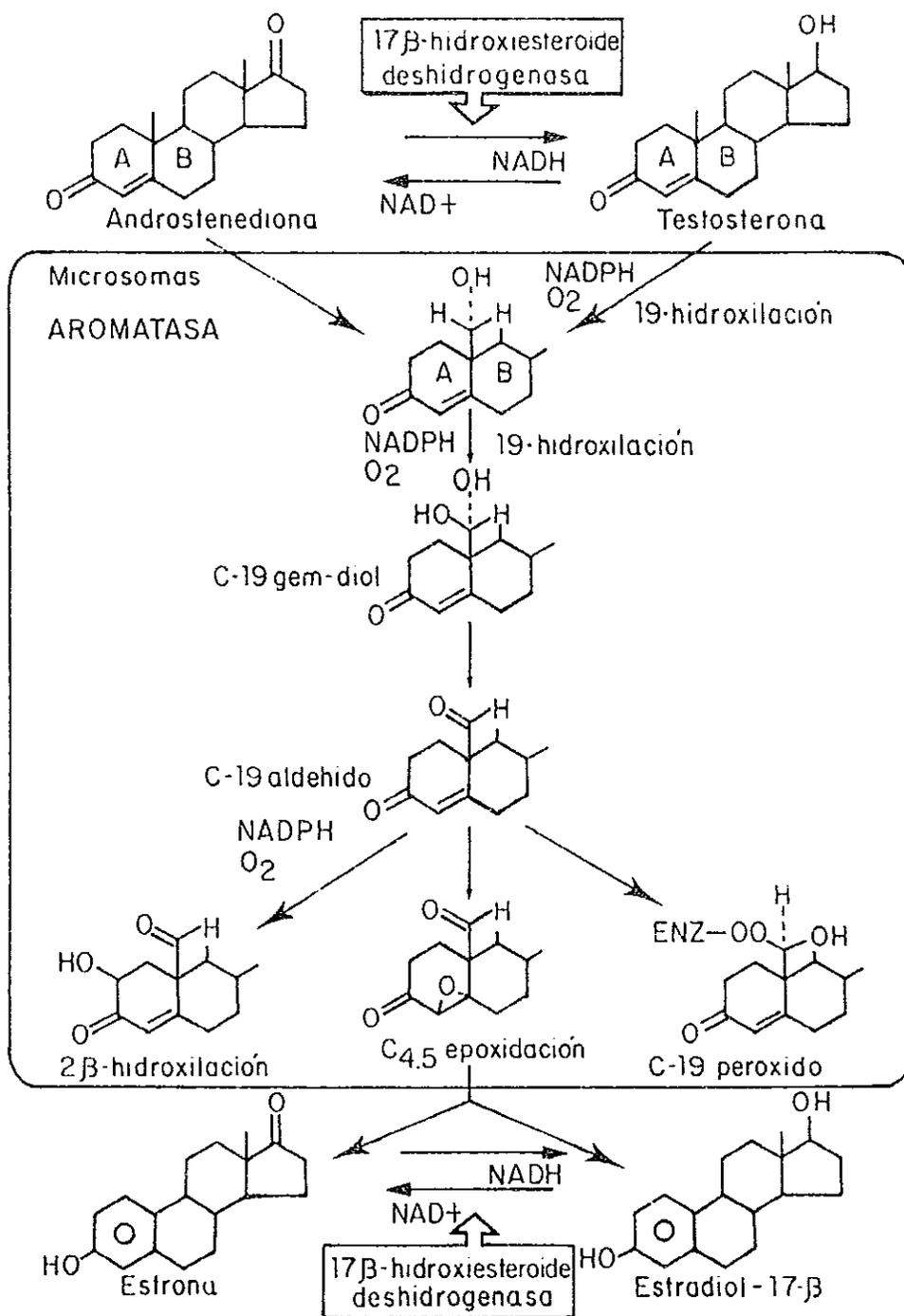
La reducción enzimática de los esteroides 4-ene-3-oxo, de la clase de las progestinas y de los andrógenos, se lleva a cabo en los tejidos ováricos de gran cantidad de especies. Las enzimas que catalizan este tipo de reacción son estereoespecíficas para la posición 5 $\alpha$  o 5 $\beta$  y utilizan NADPH como cofactor. Existen reportes que indican que después de la reducción en la posición C5, se lleva a cabo la reducción del grupo 3-oxo, sugiriendo que esta última reacción se encuentra asociada al complejo 3 $\beta$ -HSD, aunque también se ha mencionado que la 3 $\alpha$ -HSD cataliza este paso enzimático. En la mayor parte de los sistemas ováricos de mamíferos que se han estudiado, la reductasa es específica para la configuración 5 $\alpha$  (Gore-Langton y Armstrong, 1988), aunque en preparaciones de ovario de hámster se han identificado productos 5 $\beta$ -reducidos (Tsuji y cols., 1982). En las aves, la reductasa que presenta una actividad importante es la específica para la configuración 5 $\beta$ , y se ha localizado en diferentes tejidos (Steimer y Hutchison, 1981; Schumacher y

cols. 1984; Schumacher y Balthazart, 1987), incluyendo el ovario de pollo (Furr y Pope, 1970; Imataka, 1989).

### **Aromatización de Andrógenos.**

La última etapa en la esteroidogénesis ovárica es la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos por medio de una secuencia de reacciones enzimáticas conocida más comúnmente como proceso de aromatización. Durante este proceso, la androstendiona y la testosterona son transformadas en estrona y  $17\beta$ -estradiol respectivamente, por medio de la aromatasa, que se localiza en las membranas del retículo endoplásmico liso de varios tipos de células ováricas. Este complejo enzimático, es una oxidasa de función mixta que contiene citocromo  $P-450_{\text{arom}}$  y cataliza una serie de reacciones que conducen a la remoción del grupo metilo C19, seguido por la transformación del anillo "A" de los andrógenos en un anillo fenólico o aromático característico de los estrógenos. La reacción requiere de NADPH y 3 moles de  $O_2$  para llevarse a cabo (Fig. 6).

El  $17\beta$ -estradiol y la estrona son los dos estrógenos sintetizados más activamente por la gónada femenina durante el período de desarrollo folicular. A nivel ovárico existe una interconversión entre ambos estrógenos, aunque con predominio hacia el  $17\beta$ -estradiol. Estas reacciones de oxidorreducción son catalizadas por la  $17\beta$ -HSD (Fig. 5).



**Figura 6.** Biotransformación de andrógenos en estrógenos. Se ilustra la secuencia de reacciones propuesta para la aromatización de androstendiona y testosterona, así como las reacciones catalizadas por la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

## MORFOGENESIS DEL OVARIO EN LAS AVES.

El desarrollo de las gónadas de los vertebrados se inicia con la formación del epitelio germinal, el cual se observa como un engrosamiento bilateral del epitelio celómico, que se localiza en el área ventral del mesonefros en desarrollo. La proliferación de las células germinales y somáticas es lo que lleva a la formación de los primordios gonadales, que son idénticos en ambos sexos. De esta manera queda establecida la gónada indiferenciada, constituida por las células germinales primordiales (CGPs) y las células somáticas.

En el caso de las aves, las CGPs se originan en el endoblasto extraembrionario en la parte anterior al embrión y son transportadas hasta la cresta urogenital por medio del torrente circulatorio y por movimientos ameboideos (Hardisty, 1978).

En lo que se refiere al origen de las células somáticas se han planteado diferentes hipótesis. De acuerdo con un gran número de autores, los cordones sexuales primitivos se originan del epitelio germinal (En: Carlon y Stahl, 1985). Otros autores, sostienen también el origen epitelial de las células somáticas, interpretando el establecimiento de una gónada indiferenciada como el resultado de dos proliferaciones consecutivas del epitelio celómico, la primera daría origen a la médula y la segunda a la corteza (En: Merchant-Larios, 1978).

En contraste con lo anterior, Witschi (1956) sostiene que en la etapa de desarrollo de 20 a 27 somitas, parte del blastema mesonefrico que no participa en la formación de los túbulos y los corpúsculos renales, proporciona las células para la formación de la

corteza suprarrenal y la médula ovárica. Apoyan también esta hipótesis estudios más recientes realizados en embriones de pollo, que llevan a la conclusión de que la médula gonadal se origina del blastema mesonéfrico (Carlson, y cols., 1983; Carlson y Stahl, 1985).

Por otra parte Merchant-Larios sostiene que los componentes somáticos de la gónada se originan de un "blastema gonadal" formado por la condensación del mesénquima y las células del epitelio celómico (Merchant-Larios, 1978, 1984).

Una vez que las CGPs han alcanzado el brote gonadal, entran en una etapa de intensa multiplicación, que coincide cronológicamente con la proliferación de las células mesenquimatosas y del epitelio celómico, originándose así el llamado "blastema gonadal", que se sitúa en la región ventral del mesonefros.

A partir del momento en el que la gónada indiferenciada ha quedado establecida, el blastema gonadal tiende a organizarse en dos tipos de tejidos: 1) El tejido que contiene las CGPs, rodeadas por las células somáticas precursoras de las células de Sertoli o de las células de la capa granulosa y 2) el tejido estromático que dará origen al tejido conectivo, a los vasos sanguíneos y al tejido intersticial esteroidogénico, el cual estará representado por las células de Leydig o por las células de la teca interna y la glándula intersticial (Kofman-Alfaro y cols., 1982 y Merchant-Larios, 1984).

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

El ovario derecho crece lentamente desde el octavo hasta el décimo día de desarrollo embrionario, sufriendo posteriormente una regresión hasta que presenta un aspecto rudimentario en el día 15 y deja de ser funcional al nacimiento (Brode, 1928). En cambio, el ovario izquierdo experimenta un crecimiento del tejido epitelial, acompañado por un incremento del estroma y de la vascularización, hasta que se forma un ovario con dos regiones topográficas bien definidas, la corteza y la médula. La corteza ovárica muestra cordones corticales constituidos por ovogonias y/o ovocitos (a los 10 días) y células prefoliculares, que se caracterizan por presentar estructuras denominadas "lining bodies". Mientras tanto, en la médula se desarrollan gran cantidad de cordones de células secretoras de esteroides, así como un sistema lacunar característico de la gónada femenina (Carlson y Erickson, 1978; Carlson y Stahl, 1985).

Al nacimiento, la corteza ovárica está constituida por las células germinales, entre las cuales aún se reconocen algunas ovogonias aunque la mayoría se encuentra en el estadio de ovocitos primarios, que se observan en forma aislada u organizados en conglomerados o nidos. Entre los ovocitos se localizan las células prefoliculares que van rodeándolos poco a poco hasta constituir la capa de la granulosa en el adulto (González del Pliego, 1991).

Al mismo tiempo, la médula ovárica está constituida por cordones celulares rodeados por una lámina basal y un sistema lacunar delimitado por células epiteliales. De acuerdo con su ultraestructura se han identificado dos tipos celulares importantes: 1) células esteroideogénicas típicas que pueden estar agrupadas consti-

tuyendo cordones de tamaño variable y forma irregular o aisladas como células intersticiales y, 2) células poco diferenciadas que se encuentran formando nidos o cordones pequeños. Las células esteroi- dogénicas se caracterizan por presentar mitocondrias con crestas tubulares, numerosas cisternas de retículo endoplásmico liso y gran cantidad de gotas lipídicas en su citoplasma. Además se encuentran rodeadas por una lámina basal discontinua, que puede ser reempla- za por fibras de colágena y prolongaciones de fibroblastos que de- limitan los cordones celulares. Las células poco diferenciadas con- tienen un núcleo esférico u ovoide con un nucleolo prominente y presentan un citoplasma escaso y pocos organelos, representados principalmente por polirribosomas y cisternas de retículo endoplás- mico rugoso (RER). Los cordones constituídos por estas células, se encuentran rodeados siempre por una lámina basal bien definida.

Otra estructura epitelial importante que se observa en la mé- dula ovárica, está constituída por las células que delimitan los canales lacunares. Las características ultraestructurales de estas células son muy similares a las observadas en las células poco di- ferenciadas.

Las estructuras epiteliales no se encuentran distribuídas uniformemente en la médula ovárica. En la médula yuxtacortical se localizan cordones de células poco diferenciadas, islotes pequeños de células esteroi- dogénicas y algunos canales lacunares, mientras que en la médula profunda no se observan los islotes de células po- co diferenciadas y se advierten en mayor número los cordones de las células esteroi- dogénicas y los canales del sistema lacunar (Gonzá-

lez del Pliego y cols., 1988).

## PANORAMA GENERAL DE LA ESTEROIDOGENESIS OVARICA EN LAS AVES.

### Ovario Adulto.

Al igual que en los mamíferos y en otras especies de aves, en el ovario de la gallina doméstica se producen tres tipos principales de hormonas sexuales: estrógenos, andrógenos y progestágenos, siendo la fuente principal de estos esteroides las células de la granulosa y de la teca de los folículos ováricos.

El ovario de la gallina adulta está constituido por folículos de diferente tamaño, siendo los más pequeños de color blanco, con un diámetro de entre 2 y 5 mm. A partir de los 6 mm el crecimiento es muy rápido, su color se torna amarillento y se clasifican como folículos preovulatorios F6 a F1 en orden creciente de tamaño. En las aves, la ovulación se presenta cada 25 horas y F1 es el folículo de mayor tamaño (35 mm de diámetro) y el mas próximo a ovular (Gilbert, 1979).

En los folículos preovulatorios las capas de la granulosa y de la teca presentan una acción conjunta para la síntesis de hormonas esteroides, en la que las células de la granulosa producen principalmente progestinas, mientras que las células de la teca, son las fuentes principales de andrógenos y estrógenos (Huang y Nalbandov, 1979; Huang y cols., 1979; Bahr, y cols., 1983; Etches y cols., 1984). En este sentido, Huang y cols. (1979), basándose en sus observaciones, postularon una teoría bicelular para la síntesis de hormonas esteroides sexuales en la gallina de postura, similar a la

formulada en el ovario de mamíferos (En: Gore-Langton y Armstrong, 1988).

En el modelo propuesto para aves, se sugiere que las células de la granulosa de los folículos preovulatorios F1, F2 y F3, sintetizan progesterona, la cual difunde hacia las células de la teca en donde son metabolizadas a andrógenos y estrógenos. Además plantean que, conforme los folículos maduran, la actividad de las enzimas esteroidogénicas disminuye en las células tecales, mientras que se incrementa en las células de la granulosa.

Posteriormente, Porter y cols. (1989), realizaron estudios sobre el papel de las células de la granulosa, la teca interna y la teca externa en folículos preovulatorios (F1 y F5) del ovario de pavo. Los resultados obtenidos en estos trabajos, los llevaron a proponer un modelo tricelular para la esteroidogénesis en el ovario de aves, en el cual la progesterona sintetizada por las células de la granulosa es utilizada por las células de la teca interna para producir andrógenos, los cuales son metabolizados a estrógenos por la teca externa.

Por otra parte, Pedernera y cols. (1989) y Velázquez y cols. (1991) obtuvieron resultados similares al estudiar la actividad esteroidogénica en células de la teca de folículos preovulatorios (F3, F4 y F5) de gallina. Utilizando métodos mecánico-enzimáticos y gradientes de densidad, lograron aislar dos subpoblaciones celulares de la teca: una de ellas, proveniente de la teca interna, que contenía células esteroidogénicas con inclusiones lipídicas en el citoplasma secretoras de testosterona; y otra constituida por

células epiteliales poco diferenciadas aisladas de la teca externa que producían estradiol.

De manera similar, Nitta y cols. (1991) al cuantificar la producción de esteroides en células aisladas de la teca interna y externa de folículos preovulatorios (F1, F3 y F5) del ovario de gallina, además de corroborar los resultados de Pedernera (1989) y Velázquez (1991), localizaron por inmunocitoquímica, la presencia del citocromo P450<sub>scc</sub>, la 17 $\alpha$ -hidroxilasa y la aromatasa en las capas tecales; con base en los resultados obtenidos proponen una "teoría multicelular", en la cual sugieren que: a) las células intersticiales de la teca interna producen progestinas y andrógenos, b) los fibroblastos de la teca externa pueden funcionar como un sitio adicional para la conversión de progestinas a andrógenos y c) las células de la teca externa, que contienen aromatasa, requieren andrógenos para producir estrógenos.

Los trabajos mencionados hasta ahora aportan evidencias de la función esteroidogénica en los folículos preovulatorios de mayor tamaño. Sin embargo, el interés por conocer la relación existente entre dicha función y la maduración de los folículos, ha generado nuevas investigaciones efectuadas en folículos más pequeños. En este sentido Tilly y cols. (1991), examinaron las capacidades esteroidogénicas en células de la granulosa y/o de la teca, aisladas de folículos ováricos de gallina de 6-8 mm y 9-12 mm de diámetro, así como la interacción cooperativa entre los dos tipos celulares para la producción de progesterona, androstendiona y estradiol. Apoyándose en los resultados obtenidos, ellos proponen

que en los folículos ováricos de  $\leq 8$  mm de la gallina doméstica, las células de la teca son la fuente principal para la producción de esteroides  $C_{21}$ ,  $C_{19}$  y  $C_{18}$ , hasta que las células de la granulosa se transforman funcionalmente en esteroidogénicas. Además sugieren que *in vivo*, la competencia esteroidogénica de las células de la granulosa ocurre durante la transición de los folículos de 6-8 a 9-12 mm de diámetro, probablemente bajo el estímulo de la hormona folículo estimulante (FSH).

Más recientemente, Nitta y cols. (1993) estudiaron, por inmunocitoquímica, la localización de la enzima 3 $\beta$ -HSD en folículos pequeños (1-10 mm de diámetro), preovulatorios (F1, F3 y F5) y postovulatorios del ovario de gallina. Basándose en los resultados obtenidos, ellos sugieren que, 1) en los folículos pequeños la capa tecal puede transformar pregnenolona en progesterona y/o dehidroepiandrosterona en androstendiona, mientras que la capa granulosa no tiene esta capacidad, 2) en los folículos preovulatorios, tanto las tecas como la granulosa producen progesterona y/o androstendiona, 3) conforme el folículo preovulatorio madura, la capa granulosa se vuelve esteroidogénicamente más activa para la producción de progesterona, mientras que la capa tecal pierde su actividad esteroidogénica, 4) la capa granulosa conserva su capacidad esteroidogénica después de la ovulación; y concluyen que durante la maduración folicular, hay un corrimiento en la localización de la 3 $\beta$ -HSD, de la capa tecal de los folículos pequeños a la capa granulosa de los folículos preovulatorios y postovulatorios.

### Ovario Prefolicular.

El ovario de las aves es capaz de producir hormonas esteroides desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario. En el ovario de pollo se ha cuantificado la síntesis de esteroides sexuales, por medio de radioinmunoanálisis (RIA), desde el sexto o séptimo día de incubación (Guichard y cols., 1977a; Guichard y cols., 1977b, 1979; Tanabe y cols., 1986; Weniger y Chouraqui, 1988), observando que los principales esteroides sintetizados son la estrona y el 17 $\beta$ -estradiol. También, se ha encontrado que los niveles plasmáticos de estos esteroides aumentan durante el desarrollo embrionario (Woods y Brazzill, 1981; Woods y cols., 1982 y Tanabe y cols., 1979, 1986) y hay evidencias de su secreción al medio, en cultivo de órganos (Guichard y cols., 1977b, 1979; Teng y cols., 1982; Weniger y Chouraqui, 1988) y de células aisladas (Teng y Teng, 1979). Además, estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* en ovarios de pollo de 8 a 18 días de incubación, muestran que estos son capaces de responder al estímulo de la hormona luteinizante (LH) o de la gonadotropina coriónica humana (hCG), incrementando la secreción de hormonas esteroides (Haffen y cols., 1971; Teng y Teng, 1977, 1979; Guichard y cols., 1979; Woods y cols., 1981; Teng y cols., 1982; González y cols., 1987; Weniger y Chouraqui, 1988; Weniger y cols, 1989).

Por otra parte, utilizando precursores radioactivos de las hormonas sexuales, se ha demostrado que el ovario de pollo es capaz de metabolizar estos precursores desde etapas muy tempranas del desarrollo (8 a 18 días de incubación), evidenciando la presencia de

las enzimas involucradas en las diferentes vías esteroidogénicas (Haffen y Cedard, 1968; Haffen, y cols., 1971; Weniger y Zeis, 1971; Galli y Wannermann, 1972, 1973; Guichard y cols., 1973, 1977b, 1979). Imataka y cols. (1989), ampliaron esta información, explorando la transformación desde pregnenolona hasta  $17\beta$ -estradiol, para proponer un esquema de las vías metabólicas implicadas en la esteroidogénesis ovárica en el pollo de 15 días de desarrollo embrionario. Asimismo, al medir la actividad de varias enzimas esteroidogénicas en gónadas de embriones de pollo de 9 a 15 días de incubación, concluyeron que probablemente la  $17\alpha$ -hidroxilasa, la C17-20 liasa y la aromatasa sean las enzimas responsables de regular la diferenciación sexual en las gónadas del pollo durante la embriogénesis (Imataka, y cols., 1988).

La producción de esteroides en el ovario de pollo también ha sido detectada por métodos histoquímicos desde el octavo día de desarrollo embrionario hasta el nacimiento y las primeras etapas postnatales. En este sentido, existen varios trabajos que aportan evidencias de la presencia de lípidos y colesterol (Narbaitz y Sabatini, 1963) y de la enzima  $3\beta$ -HSD (Narbaitz y Kolodny, 1964; Scheib y Haffen, 1967; Narbaitz y De Robertis, 1968, 1970) en los cordones de células, con características ultraestructurales propias de las células esteroidogénicas (Narbaitz y Adler, 1966; Jordanov y cols., 1978).

Al final del desarrollo embrionario, las células productoras de esteroides son abundantes y al nacimiento, representan alrededor del 18% de la médula del ovario de pollo (González Morán y

cols., 1985). Además, hay evidencias de que el ovario de pollo recién nacido secreta  $17\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona (Tanabe y cols., 1979) y, estudios realizados *in vitro*, muestran que es capaz de metabolizar la progesterona, siendo el principal metabolito encontrado la  $5\beta$ -pregnandiona (Marrone, 1986).

#### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

La posibilidad de aislar diferentes poblaciones celulares ha permitido nuevos avances en la comprensión de las capacidades esteroideogénicas del ovario adulto, tanto en mamíferos como en aves. Esto ha ocasionado, en lo referente al grupo de las aves, que los modelos que pretenden explicar cual es la participación de los componentes celulares del ovario en la esteroideogénesis, sustentados en observaciones experimentales, se hayan ido modificando desde el modelo bicelular (Huang y Nalbandov, 1979) transformado en el modelo tricelular para la producción de esteroides (Porter y cols., 1989), hasta el planteamiento de la existencia de varias subpoblaciones celulares con diferentes capacidades esteroideogénicas en la capa tecal (Nitta y cols., 1991).

Por otra parte, se sabe que la función esteroideogénica del ovario en el pollo se inicia desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario (Weniger y Zeis, 1971; Galli y Wasserman, 1973; Guichard y cols., 1973) y continúa hasta el nacimiento (Tanabe y cols., 1979). Además, se ha detectado en la médula ovárica, la presencia de células con actividad esteroideogénica durante el desarrollo embrionario y en etapas postnatales (Narbaitz y Kolodny,

1964; Narbaitz y Adler, 1966; Scheib y Haffen, 1967; Narbaitz y De Robertis, 1968, 1970; Haffen y cols., 1971; Jordanov y cols., 1978; González Morán y cols., 1985). Sin embargo, el aislamiento de diferentes poblaciones celulares y su participación en la esteroidogénesis ha sido menos estudiada en el ovario prefolicular.

El uso de gradientes de densidad ha sido utilizado con éxito para separar células esteroidogénicas del ovario de pollo en etapas embrionarias (Teng y Teng, 1979). Más recientemente, Pedernera y cols. (1988), utilizando un gradiente de densidad de metrizamida, lograron separar dos poblaciones celulares, una de ellas, constituida por células esteroidogénicas típicas que secretan testosterona y otra enriquecida en células relativamente indiferenciadas, secretoras de  $17\beta$ -estradiol.

No obstante, es importante explorar más a fondo la función esteroidogénica en el ovario prefolicular, para comprender mejor los mecanismos de regulación enzimática que conducen al establecimiento de la función endócrina en el ovario adulto. Por este motivo, con el propósito de obtener una mejor caracterización de las capacidades metabólicas del ovario prefolicular, utilizando como modelo experimental al ovario de pollo recién nacido, el presente trabajo pretende alcanzar los objetivos descritos a continuación.

## **OBJETIVOS.**

### **General.**

Caracterizar las capacidades esteroidogénicas de distintas poblaciones celulares presentes en el ovario de pollo recién nacido.

### **Específicos.**

- 1) Aislar poblaciones celulares del ovario de pollo al nacimiento con un alto grado de pureza, por medio del uso de gradientes de densidad.
- 2) Identificar la presencia de las enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroides desde pregnenolona hasta  $17\beta$ -estradiol en las poblaciones celulares aisladas.
- 3) Establecer la relación existente entre la estructura morfológica y la función esteroidogénica en las poblaciones celulares obtenidas.

## MATERIAL Y METODOS

### MATERIAL.

#### Reactivos.

Se utilizaron medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y tripsina obtenidos de Grand Island Biological Co. (Grand Island, NY); inhibidor de tripsina, albúmina sérica bovina (BSA), 1-metil-3-isobutil xantina (MIX), metrizamida y gonadotropina coriónica humana (hCG), adquiridas de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO). La pregnenolona,  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona, progesterona,  $5\beta$ -pregnan-3,20-diona,  $17\alpha$ -hidroxiprogestero-  
na,  $\Delta_4$  androsten-3,17-diona,  $5\beta$ -androstan-3,17-diona, testosterona, estrona y  $17\beta$ -estradiol se obtuvieron de Steraloids (Wilton, NH).

La cromatografía en placa fina, se realizó en cromatofolios Al de silica gel G-60 con indicador fluorescente  $F_{254}$  (Merck, México). La purificación de los precursores tritiados se efectuó en cromatoplasmas de silica gel 60 sin indicador fluorescente.

La [ $7\text{-}^3\text{H(N)}$ ]-pregnenolona (23.5 Ci/mmol), [ $1,2,6,7\text{-}^3\text{H(N)}$ ]-progesterona (94.1 Ci/mmol), [ $1,2,6,7\text{-}^3\text{H(N)}$ ]-dehidroepiandrosterona (89.8 Ci/mmol), [ $1,2,6,7\text{-}^3\text{H(N)}$ ]-androst-4-en-3,17-diona (93.0 Ci/mmol) y [ $1,2,6,7\text{-}^3\text{H(N)}$ ]-testosterona (93.9 Ci/mmol), se compraron a NEN Reseach Products Du Pont Co. (Boston, MA).

#### Material Biológico.

Se trabajó con ovarios de pollas recién nacidas, de la raza Rhode Island (Welpline). Los animales fueron obtenidos en Armour

Hatchery de México, S.A. y se sacrificaron dentro de las 24 horas posteriores a la eclosión.

## **METODOS.**

### **Obtención de las Poblaciones Celulares.**

En todos los casos se disecó el ovario izquierdo y se lavó dos veces en solución salina balanceada libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , para eliminar la sangre acumulada en el tejido. Enseguida se realizó una disociación mecánico-enzimática utilizando una solución salina balanceada libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  con tripsina al 0.25%, a 37°C y agitación constante (90 ciclos/min) durante 30 minutos. Las células obtenidas después de la disgregación fueron tratadas con inhibidor de tripsina al 0.5% en medio DMEM y posteriormente, se lavaron dos veces en medio DMEM con BSA al 0.1%.

La suspensión celular resultante se aplicó a un gradiente continuo de metrizamida (0-15%), centrifugándose a 2000 x g durante 20 minutos. Después de este procedimiento se colectaron desde la parte superior del gradiente, 4 fracciones celulares (F1, F2, F3 y F4), las cuales se sometieron a un lavado con 10 ml de DMEM con BSA al 0.1% y se resuspendieron en 0.4 ml de medio cada una. Las fracciones denominadas como F2, F3 y F4 se aplicaron, por separado, en un segundo gradiente de metrizamida (0-15%) para obtener poblaciones celulares con mayor pureza, las cuales se colectaron y se lavaron de la manera descrita anteriormente.

Finalmente, se obtuvieron cuatro poblaciones celulares con una pureza de  $\approx 96\%$  cada una, las cuales se designaron como F1

[densidad (d)= 1.026 g/ml], F2 (d= 1.048 g/ml), F3 (d= 1.059 g/ml) y F4 (d= 1.071 g/ml). El número de células fue determinado en un hemocitómetro y la viabilidad celular por la prueba de exclusión de azul de tripan (Tennant, 1964).

#### **Estudios ultraestructurales.**

Cada una de las fracciones celulares obtenidas después del uso de gradientes de metrizamida, fueron fijadas con glutaraldehído al 2% en amortiguador de cacodilatos 0.15M a un pH de 7.4 durante dos horas a temperatura ambiente. Después de un lavado con amortiguador, se postfijaron con tetróxido de osmio al 1% en amortiguador de cacodilatos por un lapso de 45 minutos a temperatura ambiente y se deshidrataron, para ser incluidos finalmente en resina epóxica Poly/Bed (Poliscience). En algunos casos se agregó rojo de rutenio al 0.025% durante la postfijación. Tanto los cortes semifinos como los finos se obtuvieron en un ultramicrotomo Reichert; los primeros se tiñeron con azul de toluidina y los segundos fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico Zeiss EM9-S2.

#### **Metabolismo de precursores marcados con tritio.**

Para evaluar las capacidades esteroideogénicas de cada población celular se utilizaron los siguientes precursores radioactivos: pregnenolona, progesterona, dehidroepiandrosterona, androstendiona y testosterona tritiadas.

Se tomaron alícuotas de cada una de las poblaciones celulares

( $2 \times 10^6$  células) y se incubaron por separado en 1 ml de medio DMEM con BSA al 0.1%, 0.1 mM de MIX, 1.0 UI de hCG y 0.01 ml de cada uno de los precursores radioactivos como sustrato. La incubación se llevó a cabo a 37°C en un baño con agitación (90 ciclos/min), durante 15 minutos o una hora, a la cual se dio fin agregando 10 ml de eter etílico frío y se realizaron tres extracciones con 30 volúmenes del mismo en total, evaporándose a sequedad, bajo corriente de nitrógeno. El extracto etéreo se resuspendió en 0.1 ml de etanol absoluto y se tomaron alícuotas de 0.05 ml para proceder al aislamiento e identificación de los productos de biotransformación de los precursores, mediante cromatografía en placa fina.

Con cada alícuota de la muestra y por separado se aplicaron 0.5- 1.0  $\mu\text{g}$  de cada uno de los estándares de esteroides utilizados. La cromatografía en placa fina se desarrolló en dos sistemas de solventes en cada caso. La placa fue revelada primero con luz ultravioleta y posteriormente con ácido sulfúrico al 10% en solución acuosa, únicamente en la zona ocupada por los estándares.

Después de identificar los esteroides separados, se cortó la placa y cada una de las fracciones obtenidas se sumergió en 5 ml de líquido de centelleo para contar la cantidad de radioactividad existente en cada una de ellas, en un contador de centelleo Beckman LS6000. La recuperación de la radioactividad fue estimada comparando la diferencia existente entre las cpm iniciales y las cpm finales (Juárez-Oropeza y cols., 1993).

Por último, se calcularon los porcentajes de transformación de cada sustrato hacia sus metabolitos.

### **Metabolismo de Pregnenolona y Progesterona.**

Cada muestra de las poblaciones de células ováricas aisladas, fue incubada por separado con 0.12  $\mu\text{Ci}$  de  $[7\text{-}^3\text{H(N)}]$ -pregnenolona o  $[1,2,6,7\text{-}^3\text{H(N)}]$ -progesterona durante 15 minutos. Los estándares utilizados como acarreadores y para la identificación de los metabolitos fueron: pregnenolona ( $P_3$ ),  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona ( $17\alpha\text{-OHP}_3$ ), progesterona ( $P_4$ ),  $17\alpha$ -hidroxiprogesteroa ( $17\alpha\text{-OHP}_4$ ),  $5\beta$ -pregnan-3,20-diona, dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstendiona ( $\Delta_4$ ). La separación de los metabolitos de cada precursor se realizó por medio de dos procedimientos cromatográficos distintos, utilizando como sistema de solventes una mezcla de éter isopropílico, hexano y ácido acético [70:30:2 (v/v/v)] y otra de cloroformo y acetona [9:1 (v/v)].

### **Metabolismo de Dehidroepiandrosterona.**

Se tomaron alícuotas de las diferentes fracciones celulares y se incubaron individualmente con 0.12  $\mu\text{Ci}$  de  $[1,2,6,7\text{-}^3\text{H(N)}]$ -dehidroepiandrosterona durante 15 minutos. Los metabolitos se identificaron utilizando  $\Delta_4$ ,  $5\beta$ -androstandiona ( $5\beta$ -diona) y testosterona (T) como estándares. Los sistemas de solventes utilizados para desarrollar las cromatografías en placa fina fueron: diclorometano: acetato de etilo 8:2 (v/v) y éter dietílico: hexano 9:3 (v/v).

### **Metabolismo de Androstendiona y Testosterona.**

Las muestras de cada una de las poblaciones de células ováricas se incubaron con 0.12  $\mu\text{Ci}$  de  $[1,2,6,7\text{-}^3\text{H(N)}]$ -androstendiona

y [1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)]-testosterona, por separado, durante 15 o 60 minutos. Los metabolitos se aislaron por medio de dos procedimientos cromatográficos, utilizando los sistemas de solventes descritos en el apartado anterior. Los estándares utilizados para la identificación de los metabolitos de ambos precursores fueron:  $\Delta_4$ , 5 $\beta$ -diona, T, estrona (E<sub>1</sub>) y 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>).

En todos los casos los resultados se expresaron como el porcentaje de transformación del sustrato hacia cada uno de los metabolitos aislados. Estos porcentajes no se corrigieron debido a que la recuperación de la radioactividad de cada precursor fue mayor del 85% (Juárez-Oropeza y cols., 1993).

#### **Análisis Estadístico.**

Los resultados se analizaron estadísticamente por medio de Análisis de Varianza y la prueba de Tukey, utilizando el paquete estadístico SAS (SAS Institute, Cary, N.C., 1985).

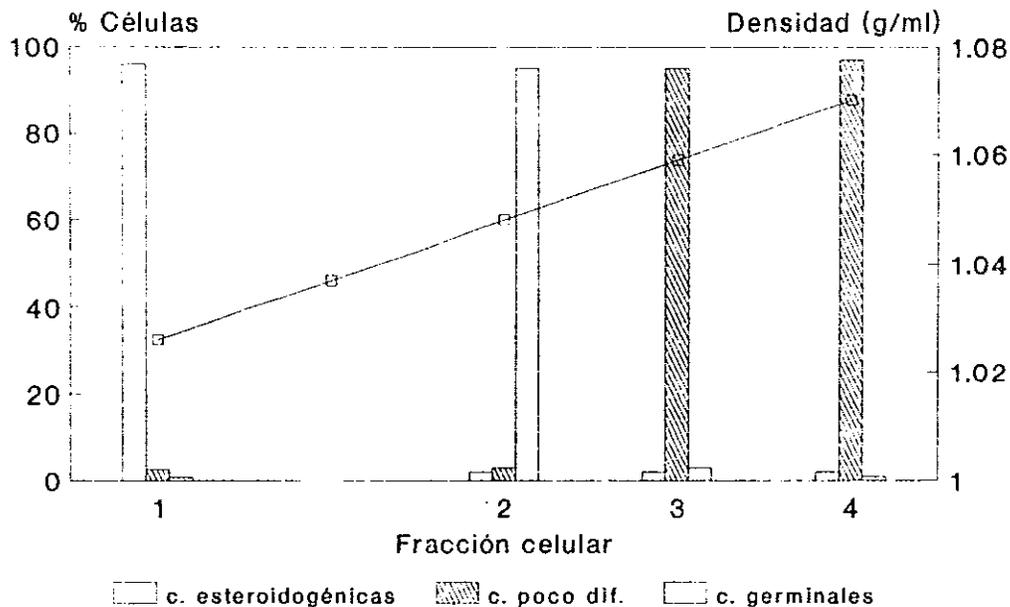
## RESULTADOS

Después de la separación de las células ováricas con dos gradientes continuos de metrizamida, se obtuvieron cuatro fracciones que contenían tres poblaciones celulares morfológicamente distintas, con una pureza superior al 95% cada una (Fig. 7). La fracción 1 [(F1) densidad (d)= 1.026 g/ml] contenía células típicamente esteroideogénicas de aproximadamente 15  $\mu$ m de diámetro, con gran cantidad de gotas lipídicas en el citoplasma (Fig. 8A). La fracción 2 [(F2) d= 1.048 g/ml] estaba constituida por ovocitos primarios, con un diámetro de 20 a 25  $\mu$ m, de forma ovoide, con núcleo excéntrico y un cuerpo de Balbiani yuxtenuclear (Fig. 8B). Las fracciones 3 y 4 [(F3) d= 1.059; (F4) d= 1.071 g/ml] estaban integradas por células somáticas poco diferenciadas, de 8 a 15  $\mu$ m de diámetro, la mayor parte de las cuales carecía de inclusiones lipídicas en el citoplasma o las presentaban en escaso número. Algunas de estas células eran de mayor tamaño (13-15  $\mu$ m) y presentaban una superficie irregular, distinguiéndose de otras más pequeñas ( $\pm$  8  $\mu$ m) con superficie lisa (Figs. 8C y 8D).

### **Características Ultraestructurales de las Fracciones Celulares.**

Las células esteroideogénicas de la fracción 1 eran células bien diferenciadas, que contenían un núcleo con poca heterocromatina y se caracterizaban por la presencia de mitocondrias grandes, lobuladas y con crestas tubulares, numerosas cisternas de retículo endoplásmico liso (REL) y abundantes inclusiones lipídicas en el

## Poblaciones Celulares del Ovario de Pollo Recién Nacido



Primer gradiente (0-15%)  
 Segundo gradiente (0-15%)

**Figura 7.** Pureza de las poblaciones celulares obtenidas en cuatro fracciones (1-4) después del segundo gradiente continuo de metrizamida. Las células se clasificaron, con base en su morfología, en: esteroidogénicas típicas, poco diferenciadas y germinales.

**Figura 8.** Cortes de 1  $\mu\text{m}$  de espesor, teñidos con azul de toluidina, correspondientes a las diferentes fracciones celulares del ovario de pollo recién nacido, aisladas por medio de gradientes de metrizamida (0-15%).

- A) Células esteroidogénicas típicas de la fracción 1, en cuyo citoplasma se distinguen gran cantidad de gotas lipídicas. X 984
- B) Ovocitos Primarios de la fracción 2, que presentan un núcleo característico en Profase I de la meiosis. X 984
- C) Células somáticas poco diferenciadas aisladas en la fracción 3 ( $d = 1.059 \text{ gr/ml}$ ), contaminada con algunas ovogonias (\*). X 984
- D) Células somáticas poco diferenciadas correspondientes a la fracción 4 ( $d = 1.071 \text{ mg/ml}$ ). X 984

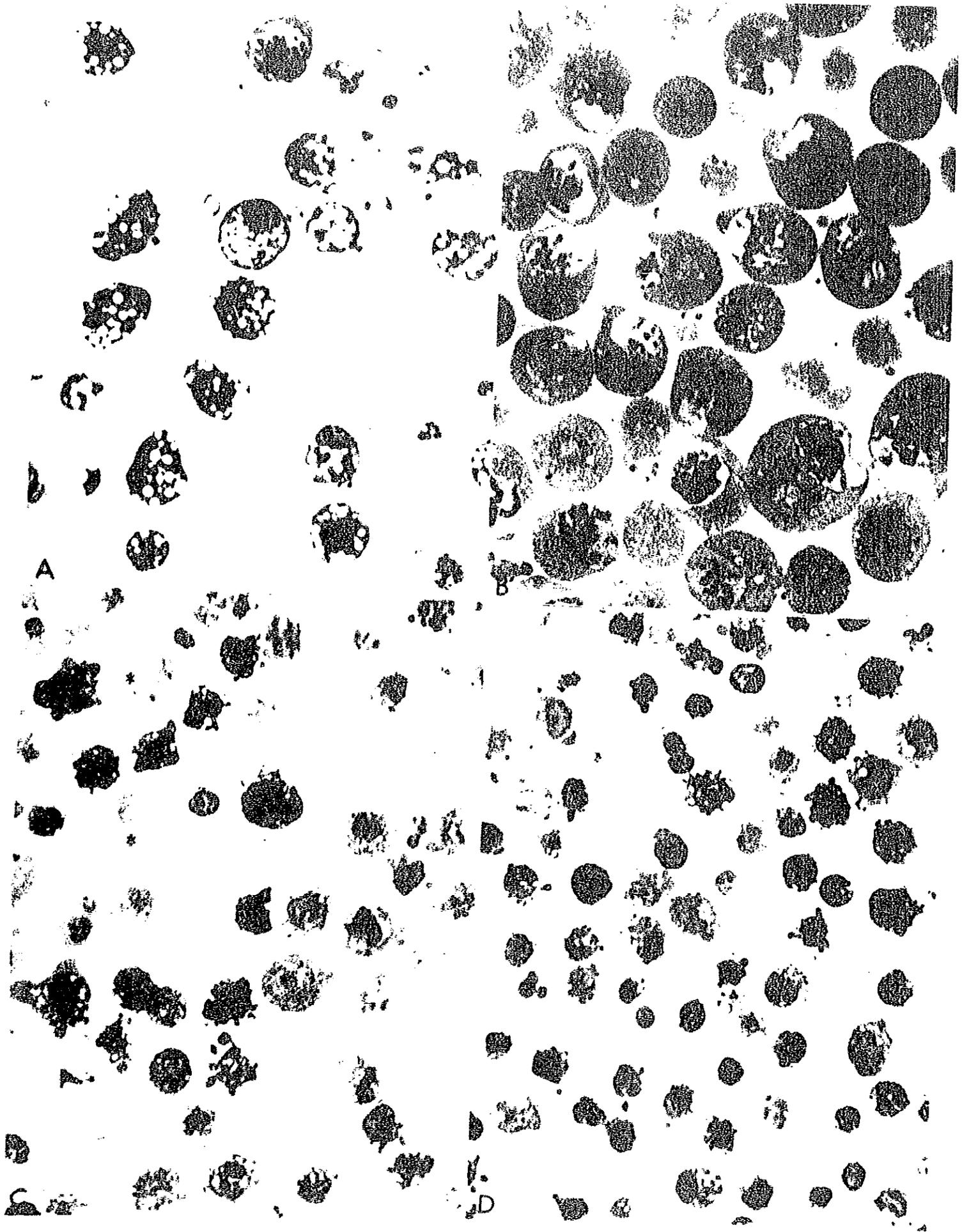


Figura 8.

citoplasma (Fig. 9A).

La fracción 2 estaba integrada por células germinales que en su mayoría se encontraban en estadio de ovocitos primarios, los cuales se distinguían por la presencia de un núcleo en profase I de la meiosis, principalmente en etapa de paquíteno, en donde se observaban claramente los complejos sinaptonémicos. En el citoplasma era evidente el cuerpo de Balbiani. (Fig. 9C).

En las fracciones 3 y 4 se identificaron 3 subpoblaciones celulares ultraestructuralmente distintas: 1) células pregranulosas, 2) células poco diferenciadas y 3) fibroblastos.

1) Las células pregranulosas contenían un núcleo grande con poca heterocromatina y uno o más nucleolos; en el citoplasma se podían observar mitocondrias, algunas cisternas de retículo endoplásmico rugoso (RER), polirribosomas y complejo de Golgi. Estas células se podían reconocer por la presencia de estructuras características en el plasmalema, denominadas "lining bodies" (Rahil y Narbaitz, 1972; Carlon y Erickson, 1978) o transosomas (Kovács y cols., 1992) (Fig. 9D).

2) Las células poco diferenciadas presentaban un núcleo grande con uno o más nucleolos, su citoplasma en ocasiones era escaso y contenía abundantes polirribosomas, algunas cisternas de retículo endoplásmico rugoso (RER) y algunas mitocondrias con crestas transversales (Fig. 9B).

3) Los fibroblastos se caracterizaban por poseer un núcleo que presentaba un borde denso de heterocromatina en la periferia, su citoplasma era escaso, con múltiples prolongaciones digitiformes y

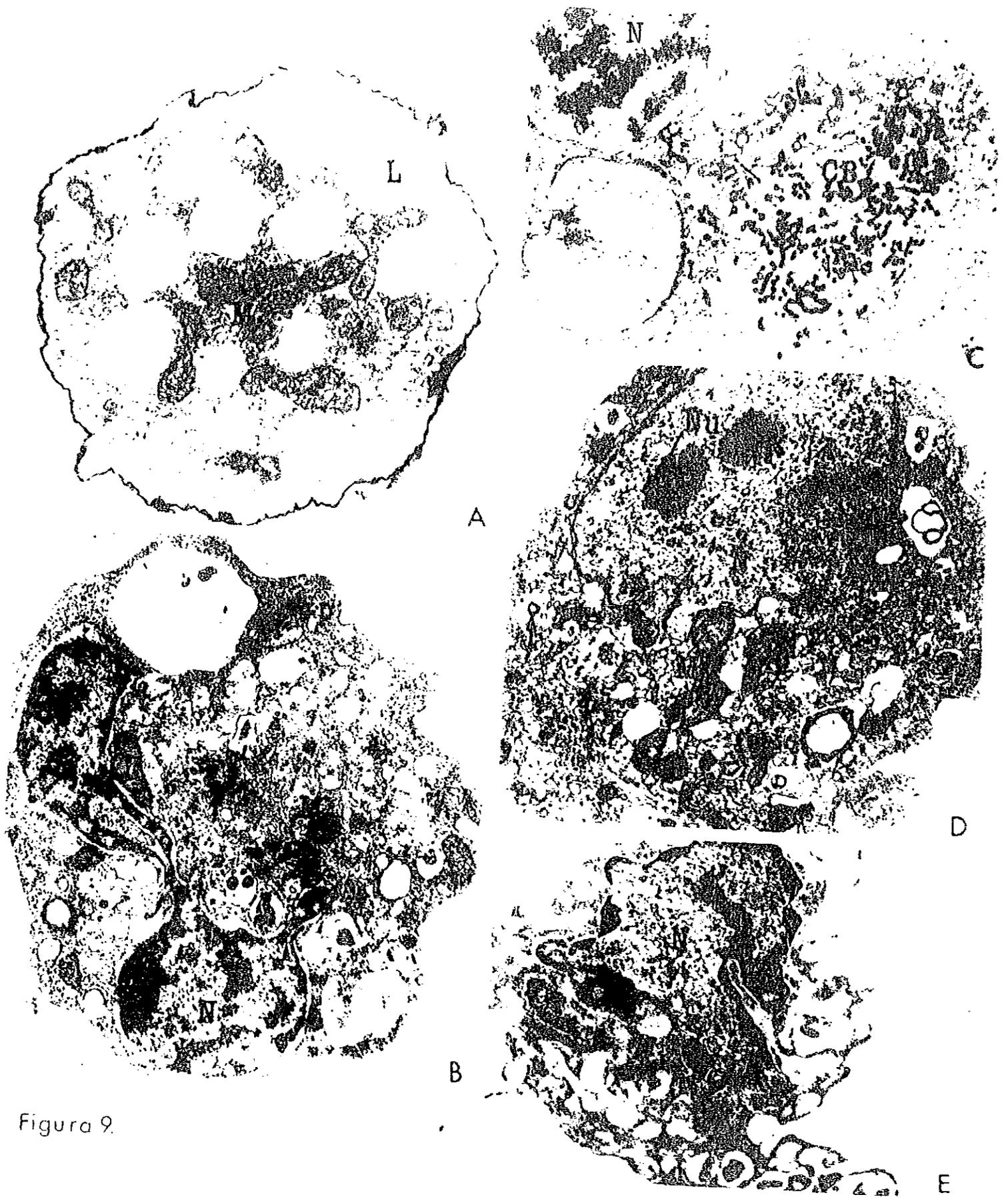


Figura 9.

**Figura 9.** Micrografías electrónicas que muestran la ultraestructura de las células ováricas de pollo recién nacido aisladas en las diferentes fracciones (F1 a F4), después del uso de gradientes de metrizamida.

- A) Célula esteroidogénica típica (F1), en cuyo citoplasma se distinguen con claridad, mitocondrias grandes, lobuladas, con crestas tubulares (M) y numerosas inclusiones lipídicas (L), características de las células esteroidogénicas bien diferenciadas. X 14,400
- B) Célula poco diferenciada (F4) con mitocondrias (M) escasas y abundantes polirribosomas (p) en el citoplasma. Núcleo (N). Cilio (†) cortado oblicuamente. X 14,400
- C) Ovocito primario (F2), con su núcleo (N) excéntrico en Profase I de la meiosis y el cuerpo de Balbiani (CB) en el citoplasma. X 4,000
- D) Célula pregranulosa (F3), con su núcleo (N) y dos nucleolos (Nu), identificada por los denominados "lining bodies" en el plasmalema (†). En el citoplasma se observan mitocondrias con crestas lamelares (M). X 12,800
- E) Fibroblasto (F4), con un núcleo característico, en el que destaca un borde denso de heterocromatina periférica. El citoplasma es escaso y presenta múltiples prolongaciones digitiformes. X 19,000

pocos organelos, entre los cuales se observaban en ocasiones mitocondrias y algunas cisternas de RER (Fig. 9E) (Laws y cols., 1985).

#### **Metabolismo de Pregnenolona.**

Las células que presentaron mayor actividad metabólica, al ser incubadas con este precursor fueron las esteroidogénicas típicas, contenidas en la fracción 1. Los principales metabolitos producidos por estas células después de 15 minutos de incubación fueron: androstendiona ( $\Delta_4$ ; 44.3%),  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona ( $17\alpha$ -OHP<sub>4</sub>; 13.3%) y Progesterona (P<sub>4</sub>; 10.6%). También se detectaron otros metabolitos como dehidroepiandrosterona (DHEA) y  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona ( $17\alpha$ -OHP<sub>3</sub>), aunque en menor cantidad (5.2% y 3.4% respectivamente) (Tabla 1).

Las otras fracciones celulares mostraron una actividad metabólica mínima. Las células somáticas de las fracciones 3 y 4 acumularon menos del 3.5% de progesterona y cantidades inferiores al 1.5% de los demás metabolitos. Los ovocitos correspondientes a la fracción 2 exhibieron una transformación inferior al 1.3% (Tabla 1).

Los porcentajes de transformación de la P<sub>4</sub> en los metabolitos detectados en F1 fueron significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) en relación con los encontrados en F2, F3 y F4.

#### **Metabolismo de Progesterona.**

Los resultados que se ilustran en la tabla 1, indican que las células esteroidogénicas típicas (F1) incubadas en presencia de progesterona durante 15 minutos, metabolizaron este sustrato a  $\Delta_4$

TABLA 1  
 METABOLISMO DE PREGNENOLONA, PROGESTERONA Y DEHIDROEPIANDROSTERONA  
 EN DIFERENTES POBLACIONES CELULARES DE OVARIO DE POLLO RECIEN NACIDO.

SUSTRATO/ Metabolitos	PORCENTAJE DE TRANSFORMACION			
	F1	F2	F3	F4
<b>PREGNENOLONA</b>				
17 $\alpha$ OHP <sub>5</sub>	3.4 $\pm$ 0.6 <sup>A</sup>	0.8 $\pm$ 0.2 <sup>BC</sup>	0.4 $\pm$ 0.1 <sup>C</sup>	1.33 $\pm$ 0.3 <sup>B</sup>
DHEA	5.2 $\pm$ 1.5 <sup>A</sup>	1.0 $\pm$ 0.5 <sup>B</sup>	1.0 $\pm$ 0.5 <sup>B</sup>	1.43 $\pm$ 0.4 <sup>B</sup>
Progesterona	10.6 $\pm$ 5.0 <sup>A</sup>	1.2 $\pm$ 0.4 <sup>B</sup>	3.3 $\pm$ 1.3 <sup>B</sup>	2.18 $\pm$ 0.2 <sup>B</sup>
17 $\alpha$ OHP <sub>4</sub>	13.3 $\pm$ 2.6 <sup>A</sup>	0.3 $\pm$ 0.1 <sup>B</sup>	0.2 $\pm$ 0.1 <sup>B</sup>	0.46 $\pm$ 0.2 <sup>B</sup>
Androstendiona	44.3 $\pm$ 6.9 <sup>A</sup>	0.9 $\pm$ 0.3 <sup>B</sup>	0.3 $\pm$ 0.1 <sup>B</sup>	1.14 $\pm$ 0.3 <sup>B</sup>
P <sub>5</sub> residual	12.5 $\pm$ 3.0	86.8 $\pm$ 1.2	88.2 $\pm$ 1.3	85.50 $\pm$ 1.3
<b>PROGESTERONA</b>				
17 $\alpha$ OHP <sub>4</sub>	16.2 $\pm$ 2.8 <sup>A</sup>	1.6 $\pm$ 0.6 <sup>B</sup>	1.2 $\pm$ 0.4 <sup>C</sup>	1.7 $\pm$ 0.4 <sup>B</sup>
Androstendiona	27.9 $\pm$ 10.0 <sup>A</sup>	< 0.1 <sup>B</sup>	N.D. <sup>B</sup>	< 0.1 <sup>B</sup>
5 $\beta$ -Pregnandiona	0.9 $\pm$ 0.3 <sup>C</sup>	2.3 $\pm$ 0.3 <sup>C</sup>	16.0 $\pm$ 4.8 <sup>B</sup>	18.4 $\pm$ 2.3 <sup>A</sup>
P <sub>4</sub> residual	59.8 $\pm$ 5.7	90.5 $\pm$ 0.3	81.4 $\pm$ 0.1	73.5 $\pm$ 1.7
<b>DHEA</b>				
Androstendiona	75.0 $\pm$ 2.8 <sup>A</sup>	4.9 $\pm$ 1.1 <sup>B</sup>	4.0 $\pm$ 1.1 <sup>B</sup>	4.3 $\pm$ 0.7 <sup>B</sup>
DHEA residual	20.0 $\pm$ 2.9	91.4 $\pm$ 2.3	91.7 $\pm$ 1.0	90.0 $\pm$ 2.0

*Poblaciones celulares: F1 (células esteroideogénicas típicas), F2 (ovocitos I), F3 y F4 (células somáticas poco diferenciadas).*

*Tiempo de incubación: 15 minutos.*

*Los valores representan la media  $\pm$  ES; n= 6.*

*<sup>A,B,C</sup> valores estadísticamente diferentes (p < 0.05) entre las distintas poblaciones celulares, para un mismo metabolito.*

(27.9%) y  $17\alpha$ -OHP<sub>4</sub> (16.2%), a diferencia de las células somáticas (F3 y F4) que acumularon menos del 1.8% de estos metabolitos ( $p < 0.05$ ). En cambio la  $5\beta$ -pregnandiona fue el principal metabolito producido por las fracciones 3 (16.0%) y 4 (18.4%), en contraposición a F1 (0.9%) y F2 (2.3%) ( $P < 0.05$ ).

#### **Metabolismo de Dehidroepiandrosterona.**

Cuando se utilizó DHEA como sustrato, el único metabolito aislado en todas las fracciones celulares después de 15 minutos de incubación fue la androstendiona. Sin embargo, las células de la fracción 1 fueron las que acumularon este andrógeno en mayor cantidad (75%), mostrando una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en relación con los porcentajes de transformación observados en las fracciones 2 (4.9%), 3 (4.0%) y 4 (4.3%) (Tabla 1).

#### **Metabolismo de Androstendiona.**

Al incubar cada una de las fracciones celulares en presencia de  $\Delta_4$  durante 15 o 60 minutos, solamente las células somáticas (F3 y F4), fueron capaces de transformarla en  $5\beta$ -androstendiona ( $5\beta$ -diona). Además, el porcentaje de transformación hacia este metabolito después de 60 minutos de incubación fue del doble o el triple, tanto en la F3 (18.4%) como en la F4 (17%), con respecto al observado al cabo de 15 minutos (7.5% y 5.4% respectivamente (Tabla 2). La actividad metabólica de las células esteroideogénicas típicas (F1) y de los ovocitos primarios (F2) fue inferior al 2%, independientemente del tiempo de incubación utilizado ( $P < 0.05$ ). Cuando la

TABLA 2  
METABOLISMO DE ANDROSTENDIONA Y TESTOSTERONA EN DIFERENTES  
POBLACIONES DE OVARIO DE POLLO RECIEN NACIDO.

SUSTRATO/ Metabolitos	PORCENTAJE DE TRANSFORMACION			
	F1	F2	F3	F4
<b>ANDROSTENDIONA<sup>a</sup></b>				
5 $\beta$ -diona	0.8 $\pm$ 0.1 <sup>C</sup>	0.9 $\pm$ 0.3 <sup>C</sup>	7.5 $\pm$ 0.8 <sup>A</sup>	5.4 $\pm$ 0.02 <sup>B</sup>
Estrona	< 0.1 <sup>C</sup>	< 0.1 <sup>C</sup>	0.5 $\pm$ 0.02 <sup>B</sup>	1.0 $\pm$ 0.05 <sup>A</sup>
$\Delta_4$ residual	94.4 $\pm$ 1.2	94.6 $\pm$ 0.9	87.2 $\pm$ 1.3	87.1 $\pm$ 0.1
<b>ANDROSTENDIONA<sup>ab</sup></b>				
5 $\beta$ -diona	0.7 $\pm$ 0.8 <sup>B</sup>	1.9 $\pm$ 0.6 <sup>B</sup>	18.4 $\pm$ 2.8 <sup>A</sup>	17.0 $\pm$ 1.7 <sup>A</sup>
Estrona	0.1 $\pm$ 0.09 <sup>C</sup>	0.7 $\pm$ 0.1 <sup>C</sup>	2.8 $\pm$ 1.1 <sup>B</sup>	9.3 $\pm$ 0.8 <sup>A</sup>
Estradiol	0.9 $\pm$ 0.4 <sup>B</sup>	0.9 $\pm$ 0.3 <sup>B</sup>	1.3 $\pm$ 0.1 <sup>B</sup>	3.4 $\pm$ 0.5 <sup>A</sup>
$\Delta_4$ residual	89.3 $\pm$ 1.0	90.0 $\pm$ 0.03	70.0 $\pm$ 5.3	61.0 $\pm$ 1.6
<b>TESTOSTERONA<sup>b</sup></b>				
Androstendiona	0.4 $\pm$ 0.2 <sup>C</sup>	0.2 $\pm$ 0.1 <sup>C</sup>	21.0 $\pm$ 1.4 <sup>A</sup>	5.2 $\pm$ 1.2 <sup>B</sup>
17 $\beta$ -estradiol	< 0.1	N.D.	0.6 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.3
T residual	90.8 $\pm$ 0.4	90.4 $\pm$ 0.2	70.7 $\pm$ 1.8	83.6 $\pm$ 2.3
<b>TESTOSTERONA<sup>ab</sup></b>				
Androstendiona	1.6 $\pm$ 0.2 <sup>C</sup>	< 0.1 <sup>C</sup>	40.9 $\pm$ 5.0 <sup>A</sup>	6.2 $\pm$ 0.4 <sup>B</sup>
5 $\beta$ -diona	N.D.	< 0.1 <sup>C</sup>	9.8 $\pm$ 3.7 <sup>A</sup>	1.9 $\pm$ 0.6 <sup>B</sup>
17 $\beta$ -estradiol	< 0.1 <sup>C</sup>	< 0.1 <sup>C</sup>	2.2 $\pm$ 0.1 <sup>B</sup>	2.9 $\pm$ 0.8 <sup>A</sup>
T residual	87.2 $\pm$ 0.7	88.8 $\pm$ 0.5	37.7 $\pm$ 5.7	76.5 $\pm$ 1.4

Poblaciones celulares: F1 (células esteroideogénicas típicas), F2 (ovocitos I), F3 y F4 (células somáticas poco diferenciadas).

Tiempo de incubación: 15 minutos<sup>-</sup> y 60 minutos<sup>-</sup>.

Los valores representan la media  $\pm$  ES; <sup>a</sup>n = 6 y <sup>b</sup>n = 4.

<sup>A,B,C</sup> Valores estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) entre las distintas poblaciones celulares, para cada metabolito.

incubación se efectuó por 60 minutos, las células somáticas de las fracciones 3 y 4 sintetizaron estrona (2.8% y 9.3%) y 17 $\beta$ -estradiol (1.1% y 3.4%) (Tabla 2).

#### **Metabolismo de Testosterona.**

Las células somáticas poco diferenciadas, F3 y F4, metabolizaron primordialmente la testosterona en androstendiona (Tabla 2). Los porcentajes de transformación hacia este metabolito en la fracción 3, después de un tiempo de incubación de 15 min (21%) y de 60 minutos (40.9%), mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en relación con los observados cuando las células de la fracción 4 se incubaron durante 15 (5.2%) y 60 min (6.2%). La cantidad acumulada de androstendiona en las células de la fracción 3 después de 60 minutos de incubación fue del doble (40.9%) en comparación con la observada al cabo de 15 minutos de incubación (21%). También se aislaron 5 $\beta$ -androstandiona y 17 $\beta$ -estradiol en las células de F3 y F4, cuando la incubación se efectuó durante 60 min. El porcentaje de transformación hacia 5 $\beta$ -androstandiona fue mayor en las células de la fracción 3 (9.8%) que en las de la fracción 4 (1.9%); mientras que la cantidad de testosterona metabolizada a 17 $\beta$ -estradiol fue del 2.2% en F3 y del 2.9% en F4 (Tabla 2). Las células esteroi-dogénicas típicas (F1) y los ovocitos primarios (F2), presentaron una actividad metabólica menor al 1.6%, independientemente del tiempo de incubación (Tabla 2).

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Nuestros resultados demuestran que el ovario de pollo recién nacido presenta varias poblaciones de células esteroideogénicas, cuyas diferencias residen no solo en su morfología, sino también en la presencia de distintas capacidades para metabolizar esteroides radioactivos exógenos.

La separación de poblaciones celulares por medio de gradientes de metrizamida se ha utilizado con éxito para aislar células de Leydig de testículos de rata (Conn y cols., 1977; Payne y cols., 1980), células productoras de esteroides del ovario de embrión de pollo (Teng y Teng, 1979) y células que secretan testosterona provenientes del ovario de pollo recién nacido (Pedernera, y cols., 1988). En el presente trabajo, el uso de dos gradientes subsecuentes de metrizamida, nos ha permitido separar tres poblaciones celulares, morfológicamente diferentes con una pureza de alrededor del 96%: 1) células esteroideogénicas típicas ( $d= 1.026$  g/ml), 2) ovocitos primarios ( $d= 1.048$  g/ml), 3) células somáticas poco diferenciadas, localizadas en dos zonas distintas del gradiente que corresponden a una densidad de 1.059 y 1.071 g/ml respectivamente.

El hecho de que las poblaciones de células esteroideogénicas fueran capaces de metabolizar distintos precursores, aunado a la prueba de viabilidad celular, muestran que el procedimiento utilizado para su aislamiento no afectó su competencia funcional. Apoyan lo anterior otros trabajos efectuados con suspensiones celulares obtenidas después de la disociación mecánico-enzimática de ovarios

de pollo recién nacidos, o aisladas por medio de gradientes de metrizamida. En estos estudios se observó que las células aisladas respondían a la estimulación con gonadotropinas (hCG y FSH), incrementando la secreción de testosterona y  $17\beta$ -estradiol (Teng y Teng, 1979; Pedernera y cols., 1988), descartándose así un daño significativo a los receptores membranales como consecuencia del método empleado.

La identificación de las células esteroideogénicas típicas en este trabajo, se efectuó con base en dos criterios: a) uno que toma en cuenta sus características ultraestructurales, como son la presencia de mitocondrias con crestas tubulares, abundantes vesículas de REL e inclusiones lipídicas en el citoplasma (Pedernera y cols., 1988); y b) otro que considera su capacidad para producir  $17\alpha$ -OHP<sub>5</sub>, DHEA, P<sub>4</sub>,  $17\alpha$ -OHP<sub>4</sub> y  $\Delta_4$  a partir de pregnenolona. La detección de estos metabolitos indica la presencia de dos complejos enzimáticos distintos: la  $17\alpha$ -hidroxilasa/C17-20 liasa y la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/  $\Delta^{5,4}$  isomerasa ( $3\beta$ -HSD). La presencia del primer complejo fue corroborada al incubar estas células con progesterona, mientras que la actividad de  $3\beta$ -HSD se constató nuevamente por la acumulación de  $\Delta_4$  al utilizar DHEA como precursor.

Por otra parte, cabe mencionar que la cantidad de pregnenolona residual fue menor que la de progesterona y DHEA, indicando así que el metabolismo de pregnenolona fue el más activo (Tabla 1). Esto sugiere que, en el ovario de pollo recién nacido, la vía de los  $\Delta_4$  es la más favorecida, de manera similar a lo que ocurre en el ovario de embrión de pollo de 15 días de incubación, (Imataka y cols.,

1989), en contraste con lo observado en el ovario de gallina adulta, en el que tanto la vía de los  $\Delta_4$  como la de los  $\Delta_5$  parecen estar involucradas en la síntesis de estrógenos (Nakamura y cols., 1974).

Considerando los criterios empleados para la identificación de las células que hemos aislado en la fracción 1, sugerimos que éstas son células esteroideogénicas bien diferenciadas, que corresponderían a las descritas por González del Pliego, y cols. (1988) y a las observadas en los estudios histoquímicos efectuados por Narbaitz y De Robertis (1968), los cuales detectaron grupos de células, localizadas en la médula ovárica de pollo recién nacido, que contenían gotas de lípidos y colesterol y mostraban reacción positiva para la  $3\beta$ -HSD. Además, nuestros resultados corroboran los obtenidos por Pedernera y cols. (1988), los cuales aislaron una población de células del ovario de pollo recién nacido con características ultraestructurales similares, que presentaban actividad de la  $3\beta$ -HSD.

Sin embargo, Pedernera y cols. (1988), también reportan que estas células son capaces de transformar testosterona en androstenediona, exhibiendo actividad de la  $17\beta$ -HSD además de secretar testosterona en el medio. Estos resultados, no concuerdan con los obtenidos en este trabajo debido a que nosotros no observamos actividad metabólica al utilizar  $\Delta_4$  o T como precursores. Es probable que esta discrepancia se deba a diferencias metodológicas en el ensayo, como pueden ser el número de células utilizado,  $10^6$  Vs.  $2 \times 10^5$  en nuestro caso, o el tiempo transcurrido durante la incubación. Pedernera y cols. detienen la incubación después de 2 horas,

mientras que en el modelo experimental empleado en este trabajo, las células se incubaron durante 15 o 60 minutos.

Los ovocitos primarios, aislados en la fracción 2 del gradiente, se identificaron morfológicamente por su forma ovoide, su tamaño (entre 20 y 25  $\mu$ m de diámetro), la presencia del cuerpo de Balbiani en posición yuxtannuclear y núcleo excéntrico en profase I de la meiosis, en el que se podía distinguir por microscopía electrónica la presencia de complejos sinaptonémicos, ya que la mayoría de ellos se encontraban en etapa de paquíteno (Fig 9C). Cuando estas células se incubaron en presencia de los diferentes precursores tritiados presentaron una actividad metabólica mínima (Tabla 1 y Tabla 2), que consideramos puede deberse a la contaminación por células con actividad esteroidogénica de las fracciones restantes. Por lo tanto, sugerimos que es poco probable la participación de esta población celular en la esteroidogénesis ovárica.

Al analizar por medio de microscopía electrónica las células de las fracciones 3 y 4, se pudieron detectar al menos 3 subpoblaciones celulares, tomando en cuenta sus características morfológicas y ultraestructurales: 1) células prefoliculares, identificadas por presentar estructuras denominadas "lining bodies" (Rahil y Narbaitz, 1972; Carlon y Erickson, 1978) o "transosomas" (Kovács y cols., 1992) en el plasmalema, 2) células poco diferenciadas, con citoplasma escaso, retículo endoplásmico rugoso, numerosos polirribosomas y mitocondrias con crestas transversales y, 3) fibroblastos identificados por su escaso citoplasma con múltiples prolongaciones digitiformes y su núcleo con un borde denso de heterocromatina pe-

riférica (Laws y cols., 1985). La razón para denominar F3 y F4 a estas dos fracciones celulares, a pesar de estar constituídas por subpoblaciones similares, fue su localización en diferentes zonas del gradiente de densidad.

En lo que se refiere a la actividad metabólica, al incubar las células de las fracciones 3 y 4 con androstendiona durante 15 minutos, solamente hubo una transformación mínima a estrona (< 1.1%). Sin embargo, al ampliar el tiempo de incubación a 60 minutos, ambas fracciones fueron capaces de sintetizar estrona, lo cual indica la presencia de la aromatasa en las dos fracciones celulares, aunque la actividad metabólica fue mayor en F4 con respecto de F3. Al incubar estas células con testosterona durante una hora se observó transformación hacia  $17\beta$ -estradiol, lo que confirma la existencia de la aromatasa. La razón de ampliar el tiempo de incubación a 60 minutos con estos precursores, se debió a la baja actividad observada en los experimentos efectuados con incubaciones cortas; los resultados obtenidos, corroboraron que para detectar la actividad de este complejo enzimático es necesario prolongar la incubación hasta 60 minutos. Sin embargo es posible que extendiendo la reacción por más de 60 minutos se puedan observar porcentajes de transformación del precursor más significativos.

Cuando se utilizó androstendiona como sustrato, otro metabolito aislado en cantidades importantes en las fracciones 3 y 4 fue la  $5\beta$ -androstandiona, siendo los porcentajes de transformación hacia este producto similares en ambas fracciones, después de 15 o 60 minutos de incubación (Tabla 2). Estos resultados indican la

presencia de la enzima 5 $\beta$ -reductasa en las dos fracciones celulares, que fue constatada al detectar la formación de 5 $\beta$ -pregnandiona cuando se utilizó progesterona como precursor. Sin embargo, la enzima resultó ser más activa para reducir a los progestágenos que a los andrógenos en ambas fracciones, ya que a los 15 minutos de incubación, se observaron porcentajes de transformación hacia 5 $\beta$ -pregnandiona similares a los detectados hacia 5 $\beta$ -diona al cabo de 60 minutos de incubación. Por otra parte, llamó la atención que al emplear testosterona como sustrato, la transformación hacia 5 $\beta$ -diona fuera mayor en F3 (9.8%) que en F4 (1.9%), solamente cuando la incubación se extendió a una hora. Esto se puede explicar por la mayor disponibilidad de androstendiona, tal como lo comentamos más adelante.

Estos resultados concuerdan con los de otros autores que han reportado la actividad de la 5 $\beta$ -reductasa en diferentes tejidos de aves (Massa y cols., 1977; Steimer y Hutchinson, 1981; Shumacher, y cols., 1984; Schumacher y Balthazart 1987; Nakamura y Tanabe, 1972, 1974; Sugimoto, y cols., 1990), incluyendo a la gónada femenina de embrión de pollo (Imataka, y cols 1988, 1989) y de gallina adulta (Furr y Pope, 1970). En este trabajo no solo corroboramos la presencia de esta enzima en el ovario prefolicular de pollo recién nacido, sino que demostramos su localización en las células ováricas aisladas en las fracciones 3 y 4. A diferencia de la mayoría de los mamíferos estudiados, en los que la reductasa es específica para la configuración 5 $\alpha$  (Gore-Langton y Armonstrong, 1988), en las aves, la 5 $\beta$ -reductasa es la que presenta una actividad importante

en diversos tejidos y órganos. Es probable que en el caso del ovario, los metabolitos  $5\beta$ -reducidos jueguen un papel importante en la regulación de la síntesis de estrógenos, secuestrando andrógenos para impedir su aromatización. Además, se sabe que la  $5\beta$ -dihidrotestosterona y otros metabolitos  $5\beta$ -reducidos incrementan la síntesis de ácido  $\delta$ -amino-levulínico y, por ende de la porfirina y del grupo hemo (Inano y cols., 1990). Sin embargo, como lo plantean Aragonés y cols. (1991) en el caso de las glándulas esteroidogénicas, como el ovario, la formación del grupo hemo probablemente contribuye más a la síntesis de citocromo P450 que a la síntesis de hemoglobina.

Aunado a lo anterior, la androstendiona fue el metabolito más abundante al incubar a las células de la fracción 3 durante 15 o 60 minutos con testosterona, indicando la presencia de la  $17\beta$ -HSD en dicha fracción. Sin embargo, el porcentaje de transformación hacia androstendiona fue casi del doble después de 60 minutos, lo cual sugiere que, bajo nuestras condiciones de trabajo, la  $17\beta$ -HSD empieza a alcanzar el equilibrio hacia los 60 minutos de incubación. Resultó de particular interés observar que la actividad de esta enzima predominó notablemente en la fracción 3, a diferencia de la  $5\beta$ -reductasa y la aromatasa, cuyas actividades se distribuyeron de manera más homogénea en ambas fracciones. Consideramos que esto puede explicar la observación de que haya una mayor transformación hacia  $5\beta$ -diona al incubar 60 minutos con testosterona a las células de la fracción 3, ya que en éstas se disponía de mayor cantidad de sustrato para la  $5\beta$ -reductasa que en las células de la fracción 4.

La 17 $\beta$ -HSD cataliza la oxidorreducción entre androstendiona y testosterona en presencia de NAD(H) o NADP(H) (Inano y cols., 1990), sin embargo bajo las condiciones experimentales de este trabajo solo se observó su actividad oxidante, debido a que no hubo transformación de androstendiona a testosterona en ningún caso. Una probable explicación para este hecho es que en las células utilizadas haya una mayor disponibilidad de NAD(P) en relación con el NADH o NADPH, ya que nosotros no agregamos ningún cofactor que favoreciera la reacción en un sentido o en otro.

En lo que se refiere a las células esteroideogénicas típicas contenidas en la fracción 2, prácticamente no presentaron actividad metabólica al ser incubadas durante 15 o 60 minutos en presencia de androstendiona o testosterona, lo cual indica que estas células no disponen de las enzimas necesarias para transformar andrógenos en estrógenos. Esto último, en conjunto con los demás resultados obtenidos en este trabajo, confirman que las células que producen andrógenos son diferentes de las que tienen la capacidad de aromatizarlos a estrógenos y, apoyan la hipótesis de que en el ovario de pollo recién nacido, existen por lo menos dos o posiblemente más poblaciones celulares involucradas en la esteroideogénesis.

No fue posible establecer una correlación entre la morfología y la función de las células contenidas en la fracción 3 y 4, debido a que al realizar los estudios ultraestructurales de estas fracciones celulares, se observó que ambas estaban constituidas por poblaciones mixtas de células prefoliculares, poco diferenciadas y fibroblastos, en menor cantidad.

A pesar de que se ha reportado escasa actividad de  $17\beta$ -HSD en cultivos de fibroblastos humanos obtenidos de glándula mamaria (Prudhomme, y cols., 1984), parece poco probable que los fibroblastos participen de manera significativa en la síntesis y metabolismo de hormonas esteroides, debido a que se encuentran en mucho menor proporción en relación con las otras dos poblaciones celulares. Además, no se ha reportado en la literatura una contribución importante de estas células en la esteroidogénesis ovárica.

También resulta difícil atribuir alguna actividad esteroidogénica a las células prefoliculares por dos razones: 1) al aislar una población de células de la corteza ovárica de pollo recién nacido, enriquecida en células pregranulosas, no se detectó secreción de esteroides en cantidades significativas (Pedernera y cols., 1988) y, 2) en el ovario adulto, las células de la granulosa, aunque ya están diferenciadas morfológicamente, son prácticamente incompetentes para producir esteroides, cuando forman parte de los folículos de 6 a 8 mm de diámetro y, al volverse esteroidogénicamente funcionales (folículos preovulatorios de 10 mm o más de diámetro), sintetizan progesterona (Tilly y cols., 1991).

Pedernera y cols. (1988) han mostrado que una población celular aislada del ovario de pollo recién nacido, enriquecida en células poco diferenciadas, es esteroidogénicamente funcional ya que es capaz de metabolizar testosterona y de secretar  $17\beta$ -estra-diol. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que las células poco diferenciadas son células con función esteroidogénica responsables de la actividad metabólica detectada en las fracciones 3 y

4 aisladas por nosotros.

La  $17\beta$ -HSD se localiza únicamente en la fracción 3, mientras que las actividades de la aromatasa y de la  $5\beta$ -reductasa se distribuyen en ambas fracciones. Esto sugiere que las células contenidas en la fracción 3 se pueden encontrar en un estado distinto de diferenciación funcional con respecto de las que constituyen la fracción 4. No obstante, para corroborar esta hipótesis, sería necesario efectuar otros estudios, que permitieran separar subpoblaciones celulares en distintos estadios de diferenciación. Una posibilidad sería el uso de lectinas, que reconocen carbohidratos específicos libres o asociados a proteínas o lípidos de membrana, que pudieran modificarse durante la diferenciación celular (Sharon y Lis, 1989), o bien, buscar la presencia de algún marcador celular característico de diferentes subpoblaciones celulares, asociado a la presencia de una actividad enzimática específica.

En conclusión, los resultados obtenidos proporcionan evidencias de que en el ovario de pollo recién nacido: 1) los ovocitos primarios probablemente no tienen una participación significativa en la esteroidogénesis ovárica y, 2) las células esteroidogénicas bien diferenciadas presentan actividad de las enzimas  $3\beta$ -HSD,  $17\alpha$ -hidroxilasa y C17-20 liasa y por lo tanto, son capaces de metabolizar progestágenos hasta andrógenos. Estos resultados también sugieren que dentro de las células poco diferenciadas existen dos subpoblaciones, una de las cuales exhibe la actividad de  $17\beta$ -HSD, mientras que la otra presenta actividad de aromatasa y de  $5\beta$ -reductasa.

Todo lo anterior evidencia la necesidad de encontrar modelos

experimentales que nos permitan estudiar de manera más detallada, los mecanismos involucrados en el proceso de diferenciación celular de cada uno de los componentes del ovario, así como de las interrelaciones celulares y los efectos microambientales que puedan generarse o modificarse a través de secreciones locales o sistémicas (gonadotropinas u otros factores proteicos). Esto a su vez, permitiría una mejor comprensión de los mecanismos que regulan el funcionamiento normal del ovario.

## REFERENCIAS

1. Aragonés, A. González, C.B., Spinedi, N.C. and Lantos, C.P. (1991) Regulatory effects of 5 $\beta$ -reduced steroids. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 39: 253-263.
2. Bahr, J.M., Wang, S.C., Huang, W.Y. and Calvo, F.O. (1983) Steroid concentrations in isolated theca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen. *Biol. Reprod.* 29: 326-334.
3. Brode, M.D. (1928) The significance of the asymetry of the ovaries of the fowl. *J. Morphol. Physiol.* 46: 1-57.
4. Carlon, N. and Erikson, G.F. (1978) Fine structure of prefollicular and developing germ-cells in male and female left embryonic gonads in vitro with and without androgenic steroids. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 18: 335-349.
5. Carlon, N., Pizant, J. and Stahl, A. (1983) Mesonephric origin of the gonadal primitive medulla in chick embryos. *Anat. Embriol.* 166: 399-414.
6. Carlon, N. and Stahl, A. (1985) Origin of the somatic components in chick embryonic gonads. *Archiv. Anat. micr. Morphol. expér.* 1: 52-59.
7. Chaffkin, L.M., Luciano, A.A. and Peluso, J.J. (1992) Progesterone as an autocrine/paracrine regulator of human granulosa cell proliferation. *J. Clin. Endocr. Metab.* 75: 1404-1408.
8. Conn, P.M., Tsuruhara, T., Dufau, M. and Catt, K.J. (1977) Isolation of highly purified Leydig cells by density gradient centrifugation. *Endocrinology.* 101: 639-642.
9. Etches, R.J. and Duke, C.E. (1984) Progesterone, androstenedione and oestradiol content of theca and granulosa tissues of the four largest ovarian follicles during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *J. Endocrinol.* 103: 71-76.
10. Furr, B.J. and Pope, G.S. (1970) Identification of cholesterol, 7-oxocholesterol, pregnenolone, progesterone, 20-hydroxypregn-4-en-3-one epimers and 5 $\beta$ -androstane-3,17-dione in plasma and ovarian tissue of the domestic fowl. *Steroids.* 16: 471-485.
11. Galli, F.E. and Wassermann, G.F. (1972) Steroid biosynthesis by testes and ovaries of 15-day-old chick embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.* 19: 509-514.
12. Galli, F.E. and Wassermann, G.F. (1973) Steroid biosynthesis by gonads of 7- and 10-day old chick embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.* 21: 77-83.
13. Gilbert, A.B. (1979) Female genital organs. En: *Form and function in birds.* Editado por A.S. King y J. McLelland. Academic Press, London, 273-360.
14. González, C.B., Charreau, E.H., Aragonés, A., Lantos, C.P., and Follett, B.K. (1987) The ontogenesis of reproductive hormones in the female embryo of the domestic fowl. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68: 369-374.
15. González del Pliego, M., González-Morán, G. and Pedernera, E. (1988) Ultrastructure of the ovarian medulla in the newly hatched chick treated with human chorionic gonadotropin. *Cell Tissue Res.* 253: 665-670.

16. González del Pliego, M. (1991) Estudio ultraestructural de las poblaciones esteroideogénicas durante el desarrollo del ovario de las aves. Tesis Doctoral, UNAM. México, D.F.
17. González-Morán, G., González del Pliego, M. and Pedernera, E. (1985) Morphological changes in the ovary of newly hatched chickens treated with chorionic gonadotropin during embryonic development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 59: 162-167.
18. Gore-Langton, R. E. and Armstrong, D.T. (1988) Follicular steroidogenesis and its control. En *Physiology of Reproduction*, Vol. 1, 1a ed. Editado por E. Knobil, J.D. Neil, L.L. Ewing, G.S. Greenwald, C.L. Markert, D.W. Pfaff. Raven Press, Ltd. New York, 331-365.
19. Granner, D.K. (1992) Hormonas de la corteza suprarrenal. En *BIOQUIMICA DE HARPER*. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. México, D.F. 12a Ed. pp. 526-539.
20. Guichard, A., Cedard, L. et 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.
21. Guichard, A., Cedard, L., Mignot Th.-M., Scheib, D. and Haffen, K. (1977a) Radioimmunoassay of steroids produced by cultured chick embryonic gonads: Differences according to Age, Sex, and side. *Gen. Comp. Endocrinol.* 32: 255-265.
22. Guichard, A., Scheib, D., Haffen, K. and Cedard, L. (1977b) Radioimmunoassay of steroid hormones produced by embryonic chick gonads during organ culture. *J. Steroid. Biochem.* 81: 599-602.
23. Guichard, A., Cedard, L., Mignot Th.-M., Scheib, D. and Haffen, K. (1979) Radioimmunoassay of steroids produced by chick embryo gonads cultured in the presence of some exogenous steroid precursors. *Gen. Comp. Endocrinol.* 39: 9-19.
24. Haffen, K. and Cedard, L. (1968) Etude en culture organotypique *in vitro*, du métabolisme de la déhydroépiandrosterone et de la testosterone radioactives, par les gonades normales et intersexuées de l'embryon de Poulet. *Gen. Comp. Endocrinol.* 11: 220-234.
25. Haffen, K., Cedard, L. and Scheib, D. (1971) Biosynthesis of steroid hormones by the chick embryonic gonads. En: *Hormones in Development*. Editado por: M. Hamburg, E.J.N. Barrington. Appleton-Century Crofts Meredith Corp., New York, 705-718.
26. Hanukoglu, I. (1992) Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J. Biochem. Molec. Biol.* 43: 779-804.
27. Hardisty, M. W. (1978) Primordial germ cells and the vertebrate germ line. En: *The Vertebrate Ovary*, 1a. ed. Editado por: Richard E. Jones. Plenum Press, N.Y., 1-45.
28. Huang, E., Kao, K.J. and Nalbandov, A.V. (1979) Synthesis of sex steroids by cellular components of chicken follicles. *Biol. Reprod.* 20: 454-461.
29. Huang, E. and Nalbandov, A.V. (1979) Steroidogenesis of chicken granulosa and theca cells: *in vitro* incubation system. *Biol. Reprod.* 20: 442-453.

31. Imataka, H., Suzuki, K., Inano, H., Kohmoto, K. and Tamaoki, B. (1988) Developmental changes of steroidogenic enzyme activities in the embryonic gonads of the chicken: The sexual difference. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 413-418.
32. Imataka, H., Suzuki, K., Inano, H., Kohmoto, K. and Tamaoki, B. (1989) Biosynthetic Pathways of testosterone and estradiol-17 $\beta$  in slices of the embryonic ovary and testis of the chicken (*Gallus Domesticus*). *Gen. Comp. Endocr.* 73: 69-79.
33. Inano, H., Ishii-Ohba, H., Sugimoto, Y., Ohta, Y., Morikawa, T. Yoshida, M. and Tamaoki, B. (1990) Purification and properties of enzymes related to steroid hormone synthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 595: 17-25.
34. Jordanov, J., Angelova, P., Boyadjieva-Michailova, A. and Bakalska, M. (1978) Ultrastructure of developing interstitial cells in chick embryonic gonad in relation to their genesis and steroidogenic function. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 92: 449-464.
35. Juárez-Oropeza, M.A., Alvarez-Fernández, G., López, V., Kawa, S. and Pedernera, E. (1993) Steroid metabolism in the cortex and the medulla of the early fetal bovine ovary. *J. Exp. Zool.* 266: 102-107.
36. Kofman-Alfaro, S., Merchant-Larios, H. y Pérez-Palacios, G. (1982) Diferenciación sexual. I. Bases biológicas del dimorfismo sexual. *Rev. Invest. Clin.* 34: 349-359.
37. Kovács, J., Forgó, V. and Péczely, P. (1992) The fine structure of the follicular cells in growing and atretic ovarian follicles of the domestic goose. *Cell Tissue Res.* 267: 561-569.
38. Laws, A.O., Wreford, N.G.M. and Kretser, D.M. (1985) Morphological and functional characteristics of rat leydig cells isolated on Percoll gradients: is Leydig cell heterogeneity in vitro an artifact? *Mol. Cell. Endocr.* 42: 73-90.
39. Loza, Ma. C., Lemus, A.E. y Pérez P. G. (1988). Metabolismo de Hormonas esteroides. En *Bioquímica e Inmunología*, 1a ed. Editado por Juan José Hicks y Juan C. Díaz Zagoya. Facultad de Medicina, UNAM., México, D.F., 53-92.
40. Marrone, B.L. (1986) Ovarian steroidogenesis *in vitro* during the first month posthatching in the domestic chick: gonadotropin responsiveness and [<sup>3</sup>H]progesterone metabolism. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62: 62-69.
41. Massa, R., Cresti, L. and Martini, L. (1977) Metabolism of testosterone in the anterior pituitary gland and the central nervous system of the european starling (*Sturnus vulgaris*). *J. Endocr.* 75: 347-354.
42. Merchant-Larios, H. (1978) Ovarian Differentiation. En: *The Vertebrate Ovary*, 1a. ed. Editado por: Richard E. Jones. Plenum Press, N.Y., 48-81.
43. Merchant-Larios, H. (1984) Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. En: *Ultrastructure of reproduction*. Editado por: Van Blerkom, J. and Motta, P.M. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 19-30.
44. Nakamura, T. and Tanabe, Y. (1972) *In vitro* steroidogenesis by testes of the chicken (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocr.* 19: 432-440.
45. Nakamura, T. and Tanabe, Y. (1974) *In vitro* metabolism of steroid hormones by chicken brain. *Acta Endocr.* 75: 410-416.

46. Nakamura, T., Tanabe, Y. and Katukawa, H. (1974) Steroidogenesis *in vitro* by the ovarian tissue of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J. Endocr.* 63: 507-516.
47. Narbaitz, R. and Adler, R. (1966) Submicroscopical observations on the differentiation of chick gonads. *J. Embryol. exp. Morph.* 16: 41-47.
48. Narbaitz, R. and De Robertis, E.M., Jr. (1968) Postnatal evolution of steroidogenic cells in the chick ovary. *Histochemie* 15: 187-193.
49. Narbaitz, R. and De Robertis, E.M., Jr. (1970) Steroid producing cells in chick intersexual gonads. *Gen. Comp. Endocrinol.* 14: 164-169.
50. Narbaitz, R. and Kolodny, L. (1964)  $\Delta^5$ - $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in differentiating chick gonads. *Z. Zellforsch* 63: 612-617.
51. Narbaitz, R. and Sabatini, M.T. (1963) Histochemical demonstration of cholesterol in differentiating chick gonads. *Z. Zellforsch* 59: 1-5.
52. Nitta, H., Mason, J.I. and Bahr, J.M. (1993) Localization of  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the chicken ovarian follicle shifts from the theca layer to granulosa layer with follicular maturation. *Biol. Reprod.* 48: 110-116.
53. Nitta, H., Osawa, Y. and Bahr, J.M. (1991) Multiple steroidogenic cell populations in the thecal layer of preovulatory follicles of the chicken ovary. *Endocrinology.* 129: 2033-2040.
54. Payne, A.H., Downing, J.R. and Wong, K.-L. (1980) Luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two distinct populations of Leydig cells. *Endocrinology.* 106: 1424-1429.
55. Pedernera, E., Gómez, Y., Velázquez, P., Juárez-Oropeza, M.A. and González del Pliego, M. (1988) Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 153-162.
56. Pedernera, E., Velázquez, P., Gómez, Y. and González del Pliego, M. (1989) Isolation of steroidogenic cell subpopulations in the follicular theca of the ovary in the domestic fowl. En: *Growth Factors and the Ovary*. Edited por: B.M. Freeman. Academic Press, New York, 323-343.
57. Porter, E.T., Hargis, B.M., Silsby, J.L. and 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.
58. Prudhomme, J.F., Malet, C., Gompel, A., Lalandrie, J.P., Ochoa, C., Boue, A., Mauvais-Jarvis, P. and Kuttann, F. (1984)  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in human breast epithelial cell and fibroblast cultures. *Endocrinology.* 114: 1483-1489.
59. Rahil, S.K. and Narbaitz, R. (1972) Evolution of the lining bodies in the embryonic chick gonad. *J. Embryol. exp. Morph.* 28: 133-140.
60. SAS user's guide (1985) SAS Institute Inc. 5th Edition. Cary, North Carolina.
61. Schelb, D. and Haffen, K. (1967) Etude histochimique de la  $3\beta$ -hydroxystéroïde-deshydrogénase des jeunes gonades embryonnaires de poulet. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 264: 161-164.

62. Schumacher, M. and Belthazart, J. (1987) Neuroanatomical distribution of testosterone-metabolizing enzymes in the Japanese quail. *Brain. Res.* 422: 137-148.
63. Schumacher, M., Contenti, E. and Belthazart, J. (1987) Partial characterization of testosterone-metabolizing enzymes in the quail brain. *Brain. Res.* 305: 51-59.
64. Sharon, N. and Lis, H. (1989) Lectins as cell recognition molecules. *Science.* 246: 227-234.
65. Steimer, Th. and Hutchison, J.B. (1981) Metabolic control of the behavioural action of androgens in the dove brain: testosterone inactivation by  $5\beta$ -reduction. *Brain Res.* 209: 189-204.
66. Stryer, L. (1990) *Bioquímica*. Ed. Reverté, S.A. Barcelona, España. 3a. ed. p. 571.
67. Sugimoto, Y., Ohta, Y., Morikawa, T., Yamashita, T., Yoshida, M. and Tamaoki, B. (1990) *In vitro* metabolism of testosterone on hepatic tissue of chicken (*Gallus domesticus*). *J. Steroid. Biochem.* 35: 271-279.
68. Tanabe, Y., Nakamura, T. Fujioka, K. and Osamu, D. (1979) Production and secretion of sex steroid hormones by the testes, the ovary, and the adrenal glands of embryonic and young chickens (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 39: 26-33.
69. Tanabe, Y., Noboru, S. and Nakamura, T. (1986) Ontogenetic steroidogenesis by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic chickens (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 63: 456-463.
70. Teng, C.T. and Teng, C.S. (1977) Studies on sex organ development: The hormonal regulation of steroidogenesis and adenosine 3'5' cyclic monophosphate in embryonic chick ovary. *Biochem. J.* 162: 123-134.
71. Teng, C.T. and Teng, C.S. (1979) Studies on sex organ development: Separation and culture of steroid-producing cells from growing and regressing embryonic ovaries. *Endocrinology.* 104: 1337-1343.
72. Teng, C.T., Teng, C.S., Bousfield, G.R., Liu, W.K. and Ward, D.N. (1982) Differential response of growing and regressing ovaries to gonadotropic hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* 48: 325-332.
73. Tennant, J.R. (1964) Evaluation of the trypan blue technique for the determination of cell viability. *Transplantation.* 2: 685-694.
74. Tilly, J.L., Kowalski, K.I. and Johnson, A.L. (1991) Stage of ovarian follicular development associated with initiation of steroidogenic competence in avian granulosa cells. *Biol. Reprod.* 44: 305-314.
75. Tsuji, M., Terada, N., Sato, B., and Matsumoto, K. (1982)  $5\beta$  and  $5\alpha$ -reductases for 4-ene-3-ketosteroids in golden hamster ovaries at different stages of development. *J. Steroid. Biochem.* 16: 207-213.
76. Velázquez, P., Gómez, Y., González del Pliego, M. and Pedernera, E. (1991) Steroidogenic cell subpopulations obtained from the theca of preovulatory follicles in the ovary of the domestic fowl. *Gen. Compar. Endocrinol.* 83: 243-248.
77. Weniger, J.P. and Zeis, A. (1971) Biosynthèse d'oestrogènes par les ébauches gonadiques de poulet. *Gen. Comp. Endocrinol.* 16: 391-397.

76. Velázquez, P., Gómez, Y., González del Pliego, M. and Pedernera, E. (1991) Steroidogenic cell subpopulations obtained from the theca of preovulatory follicles in the ovary of the domestic fowl. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83: 243-248.
77. Weniger, J.P. and Zeis, A. (1971) Biosynthèse d'oestrogènes par les ébauches gonadiques de poulet. *Gen. Comp. Endocrinol.* 16: 391-397.
78. Weniger, J.P., Chouraqui, J. (1988) Action de LH sur la sécrétion d'oestradiol par l'ovaire embryonnaire de poulet en culture *in vitro*. *Reprod. Nutr. Develop.* 28: 1473-1477.
79. Weniger, J.P., Chouraqui, J. and Zeis, A. (1989)  $17\beta$ -estradiol secretion in normal and hypophysectomized chick embryos. *Reprod. Nutr. Develop.* 29: 89-93.
80. Witschi, E. (1956) *Development of Vertebrates*. Ed. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania.
81. Woods, J.E. and Brazzill, D.M. (1981) Plasma  $17\beta$ -estradiol levels in the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44: 37-43.
82. Woods, J.E., Menella, J.A., and Thomes, R.C. (1981) The hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal axes in the developing chick embryo. I. LH sensitivity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 45: 66-73.
83. Woods, J.E., Congoran, D.D. and Thomes, R.C. (1982) Plasma estrone levels in the chick embryo. *Poultry Science.* 61: 1729-1733.

## APENDICE

Nombres triviales y abreviaturas de esteroides y enzimas, utilizados en este texto.

Pregnenolona ( $P_3$ ):  $3\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona  
17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona (17 $\alpha$ -OHP<sub>3</sub>):  $3\beta, 17\alpha$ -dihidroxi-5-pregnen-20-ona  
Progesterona ( $P_4$ ): 4-pregnen-3,20-diona  
17 $\alpha$ -hidroxiprogesteronona (17 $\alpha$ -OHP<sub>4</sub>): 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona  
5 $\beta$ -pregnandiona: 5 $\beta$ -pregnan-3,20-diona  
Dehidroepiandrosterona (DHEA):  $3\beta$ -hidroxi-5-androsten-17-ona  
Androstendiona ( $\Delta_4$ ): 4-androsten-3,17-diona  
5 $\beta$ -androstandiona (5 $\beta$ -diona): 5 $\beta$ -androstan-3,17-diona  
Testosterona (T): 17 $\beta$ -hidroxi-4-androsten-3-ona  
Estrona ( $E_1$ ): 3-hidroxi-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol-17-ona  
Estradiol ( $E_2$ ): 1,3,5,(10)-estratrien-3,17 $\beta$ -diol

$3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta^{5,4}$ -isomerasa ( $3\beta$ -HSD)  
17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ -HSD)