

00361
15
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**METABOLISMO DE LAS HORMONAS ESTEROIDES
EN LA TECA INTERNA DE LOS FOLICULOS
PREOVULATORIOS DE GALLINA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

(BIOLOGÍA)

P R E S E N T A :

YÓLANDA DE LAS MERCEDES GOMEZ Y GOMEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ENRIQUE PEDERNERA ASTEGIANO

México, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A G R A D E C I M I E N T O S

A los miembros que forman parte de mi jurado:

Dr. Enrique Pederhnera Astegiano

Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza

Dra. María Eugenia Mendoza Garrido

Dr. Pedro Nicolás Velázquez

Dra. Marta Romano Pardo

Dr. Juan Pablo Méndez Blanco

Dr. Horacio Merchant Larios

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

A mis padres y hermanos

Por el apoyo que me han brindado en todos los momentos de mi vida.

A Hever y Daniel Villa

Porque juntos con su amor me han dado el impulso para alcanzar una de mis metas.

A mis compañeros y amigos del laboratorio por su apoyo y colaboración; Ana F., Elma H., Hugo M., Irma P., Arturo N., Margarita G., Vero G., Rosalba G., Yola G., Lulú M., Adriana M. y Esther B.

I N D I C E

RESUMEN.....	ii
INTRODUCCION.....	1
Biosíntesis de hormonas esteroides.....	2
Ovogénesis, foliculogénesis y viteliginénesis en aves.....	13
Gonadotropinas y esteroidogénesis durante el desarrollo..	16
Morfología del ovario adulto de gallina.....	17
Biosíntesis de esteroides en aves.....	24
OBJETIVO.....	33
MATERIAL Y METODO.....	35
RESULTADOS.....	40
DISCUSION.....	54
CONCLUSIONES.....	64
BIBLIOGRAFIA.....	66
ANEXOS.....	71

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos preovulatorios de la gallina para metabolizar hormonas esteroides. Las siguientes hormonas esteroides tritiadas: pregnenolona (P_5), progesterona (P_4), dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenediona (A_4) y testosterona (T), fueron utilizadas como precursores.

Para este estudio se emplearon gallinas ponedoras de la raza Leghorn blanca, las cuales fueron decapitadas 6-8 horas después de la ovulación y sus folículos preovulatorios, clasificados de F1 a F6 en orden decreciente de tamaño, fueron extraídos y disecados para obtener la capa de la granulosa y la teca interna.

La suspensión de las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos preovulatorios de diferente diámetro, F1(3.5 cm), F3(2.5cm) y F5(1.5cm) fueron obtenidas por digestión enzimática con tripsina al 0.10% y 0.25%, respectivamente. Para el estudio del metabolismo de los esteroides se incubaron las células en DMEM + albúmina (0.1%) + MIX (0.1mM) + hCG (1UI/ml) en presencia de 0.1 μ Ci de cualquiera de los esteroides tritiados, durante 15 min de incubación. Posteriormente se extrajeron los esteroides del medio de incubación y fueron separados por cromatografía en capa fina, mediante dos diferentes sistemas de solventes, el primero diclorometano: acetato de etilo (8:2 v/v) y el segundo sistema éter isopropílico: hexano: ácido acético (7:3:0.2 v/v/v). La cantidad de los metabolitos producidos fue expresada como % de transformación.

Los resultados muestran que las células de la granulosa tienen gran actividad de la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) siendo capaces de transformar P_5 a P_4 con los siguientes porcentajes F1=91.52% F3=87.83% F5=74.92% y DHEA a A_4 F1=88.16% F3=91% F5=79%.

Cuando las células de la granulosa fueron incubadas con A_4 como precursor, la transformación fue a 5β -androstandiona con un 4% de conversión en los folículos F3 y F5, lo que nos indica que estas células tienen actividad de 5β -reductasa. A partir de testosterona (T) como precursor, encontramos que las células de la capa granulosa la convierten a A_4 con un porcentaje de transformación de 4.54% en el F1, y por lo tanto, la actividad de 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa está presente.

Las células de la teca interna metabolizan P_5 a P_4 , la transformación a P_4 es similar en los tres folículos estudiados (F1=10.43, F3=12.01 y F5=11.04) lo que nos indica que la actividad 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa (3β -HSD) esta presente y se mantiene durante el proceso de maduración.

Cuando las células de la teca interna son incubadas con progesterona (P_4) como precursor, el metabolito que se sintetiza en mayor cantidad es A_4 ($F_1=15.2\%$, $F_3=36.7\%$ y $F_5=49.5\%$) y en menor cantidad $17\alpha\text{-OHP}_4$, lo que demuestra la actividad de la enzima 17α -hidroxilasa y la de la $17,20$ -liasa. Los porcentajes de transformación de $17\alpha\text{-OHP}_4$ y A_4 se reducen notablemente a medida que el folículo madura, esto nos indica que la actividad del complejo enzimático 17α -hidroxilasa y la $17,20$ -desmolasa disminuye hacia el folículo F_1 .

Los andrógenos también son metabolizados por la teca interna. Cuando el precursor tritiado es DHEA la transformación es a androstenediona con los siguientes porcentajes $F_1=64.23\%$, $F_3=77.2\%$ y $F_5=80.85\%$, estos resultados confirman la actividad de la enzima 3β -HSD.

Además, las células de la teca interna transforman androstenediona en 5β -androstandiona $F_1=5.28\%$, $F_3=2.64\%$ y $F_5=0.5\%$ y testosterona en androstenediona $F_1=6.8\%$, $F_3=11.9$ y $F_5=12.6\%$ con lo que se demuestra la actividad de 5β -reductasa y de 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Con ambos esteroides se demuestra la ausencia de actividad de aromataasa en la teca interna de los folículos preovulatorios.

De estos resultados se concluye que en el folículo preovulatorio de las aves existen, diferentes poblaciones celulares que participan en la biosíntesis de las hormonas esteroides. Las células de la granulosa sintetizan progestinas, mientras que las de la teca interna producen andrógenos, principalmente androstenediona. La ruta metabólica preferencial es la de los compuestos Δ^4 .

I N T R O D U C C I O N

El ovario de las aves, está situado en el lado izquierdo del cuerpo en el extremo cefálico de los riñones y está unido a la pared somática por el ligamento mesovárico. El ovario consta de una corteza, donde localizamos a los folículos que contienen a los óvulos, y una médula compuesta por células intersticiales, vasos sanguíneos y tejido conectivo (Sturkie, 1967).

Los folículos son la unidad funcional mas importante del ovario, están formados por el ovocito rodeado de la granulosa y de la teca, que aparte de crear el microambiente del ovocito son la fuente principal de las hormonas esteroides. En las aves, la producción de progesterona ha sido demostrada en las células de la granulosa, mientras que la secreción de 17 β -estradiol, testosterona y androstenediona se observa en las células de la teca (Huang y Nalbandov, 1979; Wells et al., 1981; Marrone y Hertelendy, 1985).

Anatómicamente la teca folicular se divide en teca interna (TI) y teca externa (TE); la teca interna contiene gran cantidad de células esteroideogénicas típicas (retículo endoplásmico liso, mitocondrias con crestas tubulares y abundantes gotas de lípidos); la teca externa está compuesta por fibroblastos y nidos de células poco diferenciadas (Velázquez et al., 1991; Nitta et al., 1993)

En estudios previos utilizando cortes histológicos de la teca completa se observó la presencia de las enzimas que

intervienen en la síntesis de andrógenos y estrógenos en los folículos preovulatorios de gallina (Nitta et al., 1991).

BIOSINTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES

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

Los esteroides son lípidos no saponificables, poco solubles en agua, solubles en disolventes orgánicos y con un núcleo común que es el ciclopentanoperhidrofentreno, hidrocarburo cíclico constituido por diecisiete átomos de carbono dispuestos en tres anillos de seis carbonos cada uno que se designan como anillos A, B, C, y un anillo de cinco átomos de carbono que corresponde al anillo D (Granner, 1992).

Todos los esteroides derivan de alguno de los siguientes hidrocarburos básicos: colestano, pregnano, androstano, y estrano (Fig. 1).

El colestano es un hidrocarburo de 27 átomos de carbono (C₂₇) que es la estructura química básica a la cual pertenece el colesterol, molécula precursora de las hormonas esteroides.

El pregnano es un hidrocarburo de 21 átomos de carbono (C₂₁) característico de las hormonas esteroides con actividad progestacional, glucocorticoide y mineralocorticoide.

El androstano es un hidrocarburo de 19 átomos de carbono (C₁₉) que es la estructura química básica de las hormonas esteroides con actividad androgénica.

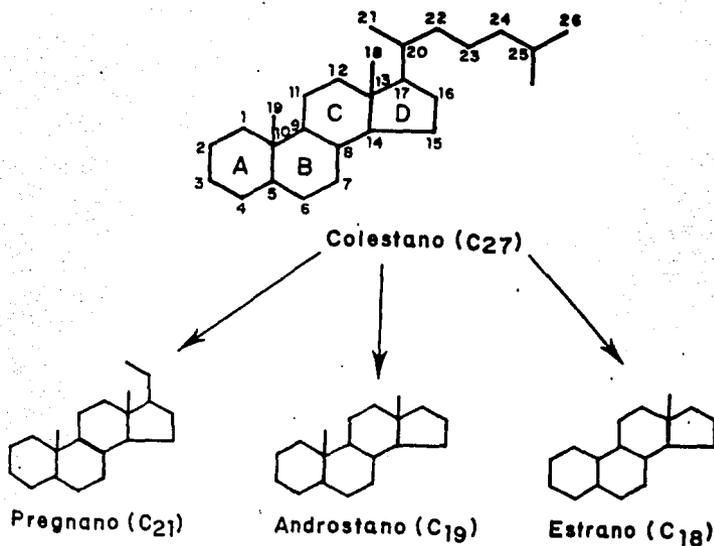


Fig. 1. Núcleos básicos de los diferentes tipos de hormonas esteroides. El subíndice indica el número de átomos de carbono de cada núcleo esteroide.

El estrano es un hidrocarburo de 18 átomos de carbono (C_{18}) en el cual se incluyen los esteroides con actividad estrogénica (Loza et al., 1988).

Biosíntesis del Colesterol

El colesterol es un intermediario obligado en la biosíntesis de hormonas esteroides, las células esteroideogénicas utilizan colesterol que proviene de tres fuentes: 1.- la síntesis "de novo" a partir de acetato, 2.- incorporación de lipoproteínas del torrente sanguíneo, 3.- las gotas intracelulares de ésteres del colesterol del citoplasma (Brown y Goldstein, 1976; Anderson y Dietschy 1978).

La biosíntesis "de novo" de colesterol es a partir de acetato. En este proceso de biosíntesis se requiere de por lo menos 27 enzimas localizadas en las fracciones microsomal y citosólica (Loza et al., 1988).

Biosíntesis de pregnenolona

Una vez que el colesterol se encuentra en el interior de las células esteroideogénicas, es necesario que penetre dentro de las mitocondrias, donde la acción de hidroxilasas y liasas desdoblan y oxidan la cadena lateral originando la pregnenolona (Kimura, 1981). La primera hidroxilación ocurre en el C-20 seguida de otra en el C-22, formándose el 20α , 22β -dihidroxicolesterol. Este proceso es catalizado por la 20α -hidroxilasa y 22β -hidroxilasa, enzimas

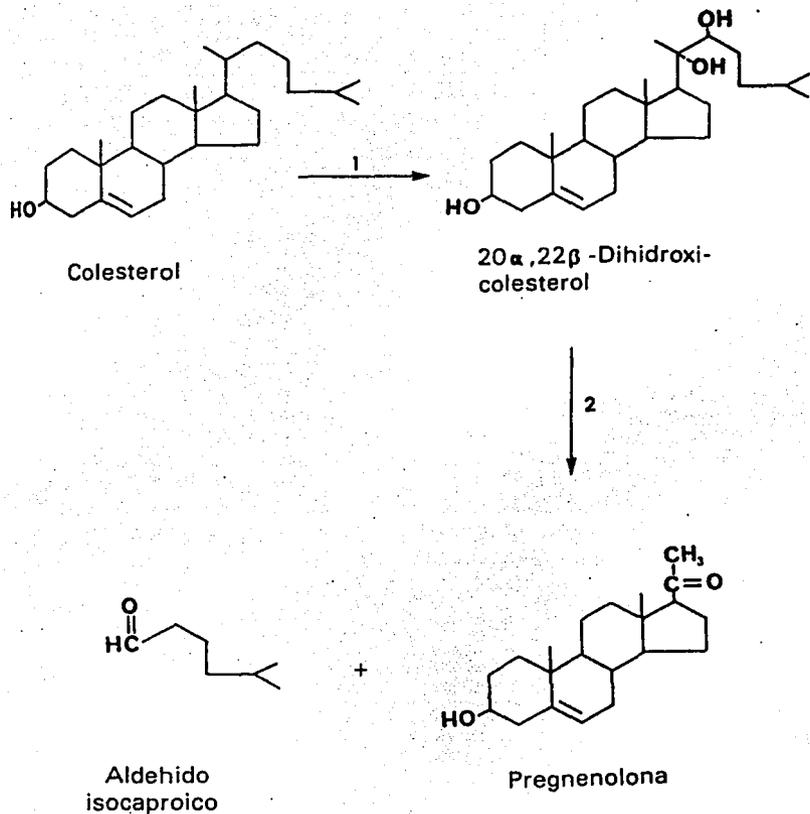


Fig. 2 Biotransformación del colesterol a pregnenolona. Los números indican las enzimas que participan en cada secuencia: 1) 20 α y 22 β -esteroide hidrogenasa; 2) 20, 22-esteroide liasa.

que requieren la presencia del citocromo P450, así como de la adrenodoxina y de una flavoproteína deshidrogenasa dependiente de NADPH. Posteriormente, se oxida el diol por un sistema enzimático mitocondrial conocido como 20, 22-esteroide liasa que requiere NADPH Y O₂, dando lugar a la ruptura de los átomos de C-20 y C-22, obteniéndose la pregnenolona (Fig. 2).

La hidroxilación en la posición alfa del C-20 del colesterol es lo que se conoce como "paso limitante", es decir, es un evento indispensable para la formación de la pregnenolona. Este "paso limitante" es activado por hormonas tróficas de naturaleza peptídica: hormona luteinizante (LH) en el ovario y el testículo, gonadotropina coriónica (hCG) en la placenta y hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la corteza suprarrenal. Es a este nivel donde ocurre la regulación de la esteroidogénesis (Kashiwagi et al., 1980).

Biosíntesis de progesterona

La formación de progesterona a partir de pregnenolona requiere inicialmente una deshidrogenación, realizada por la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^{5-4} isomerasa (3 β -HSD) del grupo alcohol en el C-3, formándose la 5-pregnen-3,20 diona. Inmediatamente por un proceso de isomerización de este compuesto, que implica la migración del doble enlace 5-6 a la posición 4-5 se forma la progesterona.

La progesterona ocupa un lugar clave en la biosíntesis de esteroides, ya que puede ser biosintetizada como producto terminal o bien servir como precursor de corticoesteroides, andrógenos y estrógenos. Esto último ocurre en la fracción microsomal (Brodie, 1983; Hall, 1984).

Biosíntesis de Andrógenos

La pregnenolona y la progesterona se biotransforman en andrógenos por una hidroxilación en el C-17 que es el primer paso para la ruptura de la cadena lateral, y es catalizado por la enzima 17 α -hidroxilasa formando 17 α -hidroxipregnenolona y 17 α -hidroxiprogesteroona respectivamente. Posteriormente, por acción de una 17, 20-esteroide liasa se rompe la unión entre los átomos C-17 y C-20. La ruptura de la cadena lateral da lugar a la formación de dehidroepiandrosterona y androstenediona. La acción secuencial de estas dos enzimas, de localización microsomal, es dependiente de NADPH y O₂ (Hall, 1986).

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

La reducción del grupo cetónico del C-17 de la androstenediona, por acción de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, transforma a este andrógeno de baja potencia biológica en testosterona que es un andrógeno biológicamente activo. Esta reacción es reversible (Hall, 1986).

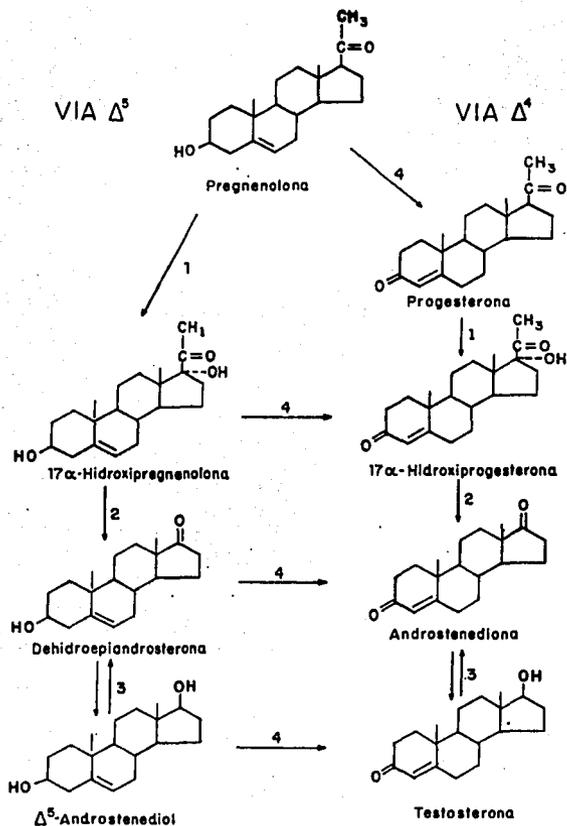


Fig. 3 Rutas de biosíntesis de andrógenos. Los números indican las enzimas que catalizan cada secuencia. 1) 17 α -esteroide hidroxilasa; 2) 17,20-esteroide liasa; 3) 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 4) 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^{5-4} isomerasa.

La dehidroepiandrosterona, por efecto de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, es transformada a Δ^5 -androstenediol el cual por acción del sistema enzimático 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa es bioconvertido a testosterona (Fig. 3).

Biosíntesis de estrógenos

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

La 17 β -reducción de androstenediona a testosterona o de estrona a estradiol, son reacciones reversibles y juegan un papel regulador en la cantidad de estrógenos producidos por el ovario (Malacara et al., 1981; Loza et al., 1988).

Biosíntesis de esteroides a nivel subcelular

La síntesis de esteroides tiene lugar en dos membranas: en la interna de la mitocondria y en la del retículo endoplásmico liso (fracción microsomal) (Hall, 1986; Gore-Langton y Armstrong, 1988). En el ovario humano el colesterol es convertido a pregnenolona en la membrana interna

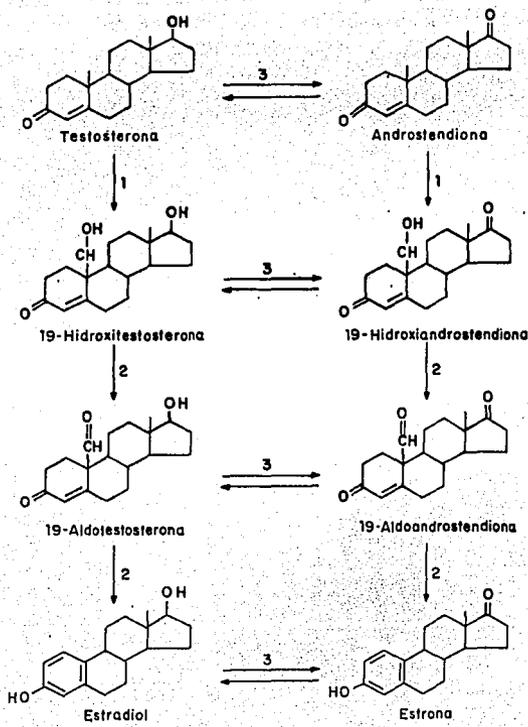


Fig. 4 Biosíntesis de estrógenos en el ovario. Los números indican las enzimas que participan en cada secuencia: 1) 19-esteroide deshidrogenasa; 2) 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD); 3) aromatasa.

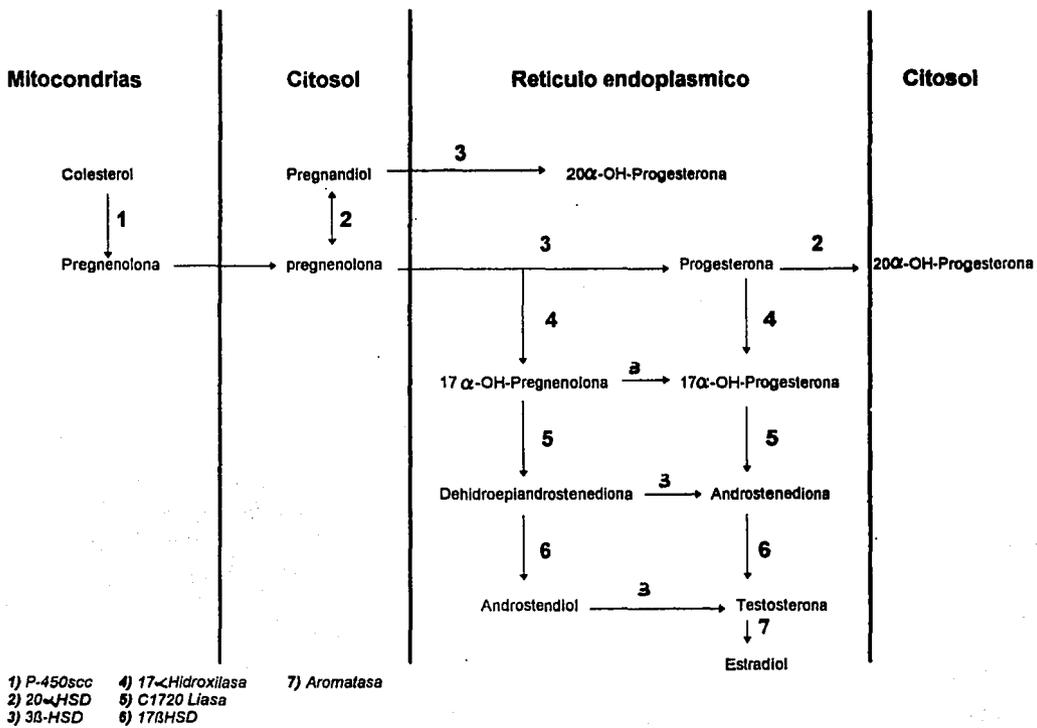


Fig. 5 Biosíntesis de esteroides a nivel subcelular.

de la mitocondria, la pregnenolona a progesterona en los microsomas y la 20α -reducción de progesterona ocurre en el citosol. En el retículo endoplásmico liso se realiza la síntesis de los esteroides a partir de la pregnenolona que fue sintetizada por la mitocondria. En la fracción microsomal es donde se lleva a cabo la aromatización de los esteroides (Brodie, 1983) (Fig.5).

METABOLISMO DE LOS ESTEROIDES REDUCIDOS EN EL OVARIO

La reducción enzimática de los esteroides 4-ene-3-oxo de las progestinas y de los andrógenos se lleva a cabo en el ovario de varias especies. Las enzimas que catalizan esta reacción son estereoespecíficas para la producción de compuestos 5α y 5β -reducidos. Las enzimas están localizadas en el retículo endoplásmico liso y utilizan NADPH como cofactor (Hall, 1986).

La reducción se lleva a cabo en la posición C-5 en el grupo 3-oxo, se dice que esta reacción se encuentra asociada al complejo 3α -HSD, formando 3α -OH-derivados de los metabolitos 5α -reducidos. Ambas, la 5α y la 3α -reducciones pueden ocurrir antes o después que se corte la cadena de C-17,20 resultando que los productos reducidos del anillo A pueden ser tanto progestinas como andrógenos (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

En la teca de los folículos de las aves se han identificado metabolitos reducidos a partir de progesterona,

principalmente 20 β -hidroxi-4-pregnen-3-ona (20 β -DHP) y en pequeñas cantidades 3 α -hidroxi-4-pregnen-3-ona (3 α -DHP) así como 17 α -,20 β -dihidroxi -4-pregnen-3-ona (17 α , 20 β -DHP) (Marrone y Hertelendy, 1985; Wiebe et al., 1990).

La actividad de los esteroides 5 β -reducidos ha sido reportada en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario del pollo, a los 3 días por Parsons (1970), pero el significado fisiológico se ha estudiado poco; se sugiere que la 5 β -androstenediona y la 5 β -pregnandiona estimulan la síntesis de hemoglobina en las aves en estados embrionarios, estos esteroides reducidos también estimulan la síntesis del ácido aminolevulinico (ALA).

OVOGENESIS, FOLICULOGENESIS Y VITELOGENESIS EN AVES

En las aves el sexo del embrión está determinado por la fórmula cromosómica, la hembra es heterogamética (ZW) y el macho es homogamético (ZZ).

En la mayoría de las aves el sistema reproductor femenino se desarrolla unilateralmente, sólo el ovario izquierdo y el oviducto izquierdo son funcionales. El crecimiento del ovario derecho es normal hasta el octavo o décimo día, empezando una regresión en el día doce de vida embrionaria, tendiendo a convertirse en un ovario diminuto y rudimentario al nacimiento. (Teng y Teng, 1979).

En las aves las CGP llegan a la cresta urogenital aproximadamente en el día 3.5 de incubación iniciándose la

diferenciación gonadal. Durante la formación del ovario se observa que al sexto y al séptimo día se forman los cordones sexuales primarios, originando la médula y a las células intersticiales de la médula; del octavo al décimo día el epitelio germinal prolifera formando la corteza y los cordones sexuales secundarios. En este momento las CGP reciben el nombre de ovogonias y rápidamente se multiplican hasta el día 17 de incubación (Hughes, 1963).

Las ovogonias inician la primera división meiótica durante el 13avo y 14avo días de incubación finalizando el día 20. Cuando se inicia la meiosis reciben el nombre de ovocitos primarios. Estos ovocitos se observan en la zona cortical del ovario formando nidos de células germinales.

Al nacimiento, el ovario queda constituido por: a) los ovocitos primarios que serán rodeados durante el 4to y 5to día después del nacimiento, b) por las células prefoliculares que se originan del epitelio celómico y c) el mesénquima de la cresta urogenital (Tokars, 1978).

Sólo un porcentaje pequeño de ovocitos madurará y la mayoría sufrirá atresia folicular.

Durante la ovogénesis en las aves las ovogonias pasan por tres etapas: proliferación, crecimiento y maduración. El estado de proliferación consiste en un aumento en el número de las ovogonias por repetidas divisiones mitóticas; el segundo estado consiste en un aumento de tamaño por el inicio de la formación y acumulación de la yema. Una vez que ha concluido

el crecimiento, el ovocito está preparado para la maduración que consiste en las divisiones reduccionales o meiosis (Bradley, 1960).

En la corteza ovárica se localizan todos los ovocitos primarios hasta antes de la ovulación. La maduración comprende dos divisiones meióticas, la primera origina un ovocito secundario y el primer cuerpo polar y ocurre 2 hr. antes de la ovulación. La segunda división finaliza en el oviducto, es probable que sea por la penetración del espermatozoide como en los mamíferos.

Durante la maduración el ovocito sintetiza grandes cantidades de RNA de transferencia (tRNA), RNA ribosomal (rRNA) y tiene un aumento en la cantidad de mitocondrias.

La mayoría de las proteínas del vitelo provienen del hígado de la hembra, lípidos y fosfoproteínas son sintetizados en él; la vitelogenina pasa al torrente sanguíneo y es captada por el ovocito mediante pinocitosis.

La yema contiene casi un 50% de agua, 33% de material graso, 16% de proteína y sólo 1% de carbohidratos. Entre las principales proteínas que contiene están la vitelina (lipovitelina) y la lipovitelina, proteínas que unen gran parte de los lípidos que hay en la yema; la fosvitina, enlaza la mayor parte del fósforo y una clase de proteínas solubles en agua llamada livetina, que es idéntica a varias de las proteínas normales del suero. Además contiene vitamina A, B1, B2, D y E. (Gilbert, 1971; Farner y King, 1973).

GONADOTROPINAS Y ESTEROIDOGENESIS DURANTE EL DESARROLLO DEL OVARIO

Weniger et al. (1988, 1991) realizaron una serie de experimentos para establecer cuándo se inicia el control de la secreción de esteroides en el ovario por la hipófisis. En embriones de pollos de 8 a 19 días de incubación, hipofisectomizados o con una operación-simulada, se cuantificó por radioinmunoanálisis (RIA) la cantidad de 17 β -estradiol liberado por el ovario al medio. Los resultados permiten concluir que la hipófisis controla la secreción de 17 β -estradiol en el ovario de pollos desde los 11.5 días de incubación.

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

La respuesta temprana "in vitro" de la gónada a la LH, no nos indica que ya esté establecido el eje hipófisis-gónada,

sino hasta que es detectable la LH en la circulación sanguínea del embrión, por lo que el eje hipotálamo-hipófisis-gónada funciona independientemente hasta el día 13.5 de incubación en machos y el día 14.5 en hembras (Gilbert, 1971; Woods et al., 1981).

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

MORFOLOGIA DEL OVARIO ADULTO DE GALLINA

El ovario está formado por la corteza que contiene los folículos corticales y la médula compuesta principalmente de tejido conectivo y una gran vascularización. En las pollitas recién nacidas estas dos áreas son distinguibles pero en la adulta se pierde esta división (Sturkie, 1967; Perry et al., 1978). Antes de la madurez el ovario de gallina consta de una masa de cientos de miles de pequeños folículos, de los cuales sólo unos pocos alcanzan la madurez y son ovulados (Hughes, 1963).

Durante la madurez sexual, los folículos crecen hasta

alcanzar un diámetro aproximado de 40 mm antes de la ovulación (Sturkie, 1967).

La superficie del ovario está cubierta por el epitelio superficial y de una capa de tejido conectivo, la túnica albugínea, que aparece en el día 14 de desarrollo embrionario y se desdibuja en el séptimo día de vida posnatal (Hodges, 1974).

Debajo de la túnica albugínea está el estroma, constituido por tejido conectivo laxo y numerosos vasos sanguíneos. Este estroma de la corteza está formado por células alargadas con un núcleo basófilo. Las células intersticiales están localizadas principalmente en el hilius del ovario maduro, son células poligonales con núcleo oval, citoplasma claro y gotas de lípidos.

En la corteza de ovarios maduros, particularmente de ovarios viejos, encontramos células con vacuolas de grasa, citoplasma claro, núcleo pequeño y aparentemente degenerado y no presentan reacción histoquímica positiva para enzimas relacionadas a la producción de esteroides (Hodges, 1974).

En la corteza del ovario se encuentran distintos tipos de folículos que pueden clasificarse en: a) los folículos preovulatorios (10-35 mm de diámetro) arreglados en orden decreciente de tamaño (F1 a F6), b) folículos amarillos pequeños (6-10 mm), c) blancos, grandes y chicos (1-6 mm) y folículos corticales de menos de 1 mm de diámetro (Nitta et al., 1991a).

En las aves la maduración de los folículos primarios es continua y cada día, con pocas excepciones, un nuevo folículo está capacitado para madurar a partir de la semana 24-30 de nacimiento. El crecimiento y la maduración de los folículos ováricos están dadas por la acción de la hormona folículo estimulante (FSH), liberada por la hipófisis anterior.

El folículo preovulatorio de las aves anatómicamente está formado por varias regiones de afuera hacia adentro: el epitelio superficial, la túnica albugínea, la túnica superficial, la teca externa, la teca interna, la lámina basal, la capa de la granulosa, la capa perivitelina, zona radiata, la membrana vitelina y el ovocito. Estos folículos no tienen antrum (Wells y Gilbert 1984; Nassau et al., 1994).

TUNICA SUPERFICIAL.- Está compuesta de una red de tejido conectivo que rodea al folículo y al tallo. En esta capa se localiza el sistema lacunar que se comunica a la cavidad peritoneal (Nassau et al. 1994).

Los folículos maduros están inervados por fibras colinérgicas y adrenérgicas y se encuentran altamente vascularizados. En la superficie del folículo se observa un área que parece avascular, el estigma, pero el examen al microscopio demuestra que existen arterias y venas que lo atraviesan, esta región será rota para permitir la ovulación (Gilbert, 1971a; Callebaut, 1990).

El ovario recibe su aporte sanguíneo de la arteria

ovárica, que se origina de la arteria renolumbar izquierda. La arteria ovárica se ramifica y usualmente de dos a cuatro ramas arteriales cursan hacia el pedículo folicular.

Algunas arterias rodean al ovocito después de ramificarse, pasan a través de la teca, se transforman en arteriolas y forman una red capilar periférica a la membrana basal (Sturkie 1967).

El sistema venoso del folículo forma tres capas o redes; 1) la más profunda localizada en la teca interna; 2) una media que rodea a la teca externa; 3) la capa superficial que rodea circularmente al folículo y lo abandona por el pedículo. Todas las venas del ovario vacían en la cava posterior (Sturkie, 1976; Nassauw et al., 1994).

TECA EXTERNA.- Se conecta con el tejido cortical del ovario y está constituida por varias capas de fibroblastos, fibras de colágena, músculo liso y nidos de células epiteliales indiferenciadas; el espesor de esta teca disminuye a medida que el folículo va madurando (Hernández-Vértiz et al., 1993).

Las fibras de músculo liso de la teca externa se presentan en toda la pared folicular especialmente en el estigma en los folículos maduros. Nassauw et al. (1994) demuestran que la teca externa del folículo F1 tiene un sistema contractil formado por músculo liso que se retrae durante la ovulación bajo un control neuronal. Este sistema

contractil es comparable con el de los mamíferos y reptiles.

En 1970, Dahl describe la presencia de nervios en las paredes de los vasos sanguíneos de los folículos y sugiere que la ruptura del folículo está bajo un control neurogénico que afecta a las fibras de músculo liso.

La contracción de la teca externa durante la ovulación es inducida por una disminución de tensión pasiva en la pared folicular, ocasionada ésta por una proteólisis del estigma, el papel de la teca externa durante la ovulación es mantener una presión intrafolicular constante (Nassauw et al., 1994).

Los estudios ultraestructurales de la teca externa han determinado que hay acúmulos de células epiteliales que se localizan en toda la periferia folicular. Las características de estas células son: un núcleo con dos o mas nucléolos, polisomas, un retículo endoplásmico rugoso con pocas cisternas y mitocondrias con crestas tubulares; no contienen retículo endoplásmico liso y las inclusiones lipídicas son ocasionales. Estos acúmulos epiteliales están delimitados por una lamina basal; los islotes de células indiferenciadas son muy evidentes en los folículos pequeños y están prácticamente ausentes en el folículo maduro (F1) (Velázquez et al., 1991; Hernández-Vértiz et al., 1993).

Algunas fibras nerviosas amielínicas se observan en esta zona (Perry et al., 1978).

TECA INTERNA.- Es compacta y de menor grosor que la teca

externa, alrededor de un tercio menor. Tanto la teca interna como la externa se modifican en grosor de acuerdo al grado de desarrollo de cada folículo (Hodges, 1974).

La teca interna está constituida por células fusiformes de núcleo oval y fibras de colágena, contiene islotes de células esteroideogénicas típicas; son células con abundante retículo endoplásmico liso (REL), mitocondrias con crestas tubulares y gotas lipídicas, y están en contacto directo con vasos capilares y terminaciones nerviosas (Dahl, 1971).

Estas células esteroideogénicas son la principal población de células de la teca interna y corresponden a las células denominadas vacuolares, intersticiales o glandulares (Dahl, 1970; Nitta et al., 1991b).

El área de estas células esteroideogénicas típicas va disminuyendo durante la maduración folicular. Sin embargo, considerando el aumento en el diámetro del folículo, la estimación absoluta del volumen del tejido esteroideogénico aumenta en los folículos en maduración (Hernández-Vértiz et al., 1993).

MEMBRANA BASAL.- Separa la teca interna de las células de la granulosa y es una membrana de 1 μm de grosor, Está compuesta de glucoproteínas y fibronectina; el grosor de ésta varía en los diferentes estadios del crecimiento folicular, es una barrera de permeabilidad selectiva entre la granulosa y la teca (Hodges et al., 1974; Perry et al., 1978).

CELULAS DE LA GRANULOSA.- son en un principio un epitelio aplañado que rodea al ovocito del folículo primordial. Conforme transcurre la diferenciación de los folículos, las células granulosas forman una sola capa de células pseudoestratificadas alrededor del ovocito. A diferencia de los mamíferos estas células no forman un antro folicular y sólo persisten como una capa única durante toda la vida del folículo. (Farner y King, 1973; Perry et al., 1978; Wells y Gilbert, 1984).

El núcleo de las células de la granulosa es grande, esférico y contiene masas cromafines, mientras que el citoplasma contiene gránulos de lípidos.

En el momento en que se inicia la vitelogénesis las células de la granulosa disminuyen de tamaño y reducen sus organelos, únicamente el REL y las mitocondrias de crestas tubulares son abundantes, el epitelio pseudoestratificado se modifica en un epitelio cúbico aplanado; durante esta etapa se incrementan los lípidos, triglicéridos y fosfolípidos que forman los gránulos de vitelo (Farner y King, 1973; Wells y Gilbert, 1984).

Las células de la granulosa forman prolongaciones que se dirigen hacia la membrana del ovocito, los "lining bodies" o "transosomas" característicos de los folículos perivitelinos en desarrollo (Hodges, 1974).

MEMBRANA PERIVITELINA.- Es una capa acelular que separa

a las células de las granulosa del ovocito y es probablemente secretada por las células de la granulosa.

ZONA RADIADA.- Es la región más periférica del ovocito, está formada de finas prolongaciones de las células de la granulosa hacia la membrana del ovocito (Hodges, 1974).

El ovocito está limitado externamente por la membrana plasmática del mismo, la membrana vitelina y la perivitelina mas externa.

Internamente, estas prolongaciones tienen un arreglo flojo de mitocondrias, aparato de Golgi y REL. Además esta zona periférica está caracterizada por la presencia de numerosos canales iónicos, por vesículas de pinocitosis y es de naturaleza transitoria ya que se desarrolla durante el crecimiento del ovocito y desaparece en el huevo maduro (Perry et al., 1978). Esta zona radiata mide 5 μm de grosor y es la región de contacto entre el ovocito y el folículo (Gilbert, 1971a). La función de esta estructura es aumentar la superficie de absorción del ovocito y facilitar el transporte de nutrientes a él.

BIOSINTESIS DE ESTEROIDES EN AVES

El ovario de gallina secreta los tres tipos de hormonas sexuales; estrogénos, andrógenos y progesterona. Dentro del ovario las células intersticiales, las de la granulosa y de la teca están involucradas en la esteroidogénesis (Wells y

Gilbert, 1984; Huang y Nalbandov, 1979; Marrone y Hertelendy, 1963a). Estas hormonas sexuales tienen efectos fisiológicos y anatómicos en la gallina, ya que determinan sus caracteres sexuales secundarios como son: la forma de la cresta, plumas, depósito de grasa corporal y metabolismo del calcio. En el oviducto inducen su crecimiento, la síntesis de proteínas y el movimiento del huevo. Estas hormonas esteroides determinan su conducta sexual (Gilbert, 1971b; Wells y Gilbert, 1984; Nitta et al., 1991a)

Las células de la granulosa de los folículos maduros producen la progesterona y no tienen actividad de aromatasa, mientras que las células de la teca producen andrógenos y 17 β -estradiol (Huang y Nalbandov, 1979; Wells et al., 1981; Marrone y Hertelendy, 1983 y 1985).

La producción de las hormonas esteroides durante la maduración de los folículos está regulada por la hormona luteinizante (LH). Cuando las células de la granulosa de los folículos preovulatorios F1, F2 y F3 son estimulados con LH, hay un incremento en la liberación de progesterona (Marrone y Hertelendy, 1983b). Estudios "in vitro" e "in vivo" han demostrado que las células de la granulosa de los folículos pequeños F3 y F5 incrementan su producción de progesterona de 2 a 9 veces con LH bovina. En contraste con la respuesta a FSH que es menos marcada (Wells et al., 1985).

Respecto a la secreción de progesterona por los folículos preovulatorios de gallina, se ha reportado al F1 como el

principal productor, disminuyendo hacia el F5 (Marrone y Hertelendy, 1983a; Nitta et al., 1993).

El pico de LH ocurre de 6 a 8 hrs antes de la ovulación y va acompañado de un aumento de progesterona (Gilbert, 1971; Huang y Nalbandov, 1979).

En los folículos preovulatorios las células de la granulosa son el principal órgano blanco de la LH, mientras que en los postovulatorios no responden a esta hormona (Nitta et al., 1993).

Las células de la teca, particularmente de los folículos preovulatorios F3 Y F5, convierten la pregnenolona y la progesterona en 17α -hidroxiprogesterona, androstenediona, testosterona y 17β -estradiol, mientras que las células de la granulosa de estos mismos folículos sólo producen progesterona (Huang et al., 1979; Wells y Gilbert, 1984; Nitta et al., 1991).

En los mamíferos, las células de la teca metabolizan el colesterol a progesterona y andrógenos (androstenediona y testosterona), los cuales atraviesan la membrana basal y son incorporados al citoplasma de la célula de la granulosa donde son metabolizados a estrógenos. Este fenómeno es la base de la teoría bicelular en la biosíntesis de hormonas esteroideas del folículo ovárico (Brodie, 1983). Cuando las células de la teca interna y las células de la granulosa de los folículos preovulatorios son incubadas por separado, producen pocos andrógenos aun con la presencia de gonadotropinas (FSH y LH).

Sin embargo cuando son cultivadas juntas aumenta la biosíntesis de andrógenos con o sin gonadotropinas. Las células de la granulosa producen progesterona bajo la influencia de FSH y LH, mientras que las células de la teca sintetizan andrógenos bajo la influencia de LH. La producción de progesterona liberada por las células de la granulosa es utilizada por las células de la teca interna para sintetizar andrógenos, los cuales son además convertidos en estrógenos por las células de la granulosa que tienen alta actividad de aromatasas (Yi y Hsueh, 1986). La cooperación entre estos dos tipos celulares es un requisito para la producción de estrógenos por las células de la granulosa en los mamíferos.

En las aves, fue propuesto por Huang et al. (1979) un modelo bicelular, estos autores postulan que las células de la granulosa producen exclusivamente progesterona y esta hormona sirve como precursor en el tejido tecal para formar los andrógenos y los estrógenos. Los mismos autores sugieren también que durante la maduración folicular, la actividad metabólica disminuye en las células de la teca, mientras que en la granulosa la actividad aumenta con la madurez.

Recientemente se ha demostrado que en la teca de los folículos preovulatorios de pavo participan dos tipos celulares en la secreción de estrógenos y andrógenos. Las células de la teca interna del folículo F5 secretan testosterona y progesterona pero no 17β -estradiol, por otro

lado la producción de 17 β -estradiol fue detectada en la teca externa (Porter et al., 1989), un fenómeno similar se observó en el pollo por Pedernera et al. (1989); Velázquez et al. (1991) y Nitta et al. (1991b).

La síntesis de 17 β -estradiol es mayor en los folículos preovulatorios pequeños y disminuye hacia el F1, lo que indica que mientras el folículo madura disminuye la actividad de aromatasa (Bahr et al., 1983; Marrone y Hertelendy, 1983; Nitta et al., 1991b). En forma similar las células que son positivas para la aromatasa (Nitta et al., 1991b) se reducen en forma importante en el folículo mas maduro (Hernández-Vértiz et al., 1994).

En el mismo sentido Pedernera et al. (1989) utilizando la teca del folículo F5 y un gradiente de metrizamida (0-30%), separan las tecas en varias fracciones celulares a las que cuantifican la secreción de 17 β -estradiol y testosterona por RIA. Ellos reportan que son dos tipos de células morfológicamente distintas y con diferente densidad las que intervienen en la producción de testosterona y estradiol. Las células productoras de testosterona son células esteroidogénicas típicas con inclusiones lipídicas en su citoplasma y las localizan en la teca interna; las células que secretan 17 β -estradiol son células epiteliales con características de poco diferenciadas y están en la teca externa (Velázquez et al., 1991).

Nitta et al. (1991b) realizan una serie de experimentos

en los que separan la teca interna y la teca externa de los folículos preovulatorios F3, F4 y F5, cuantificando la producción de progesterona (P_4), testosterona (T) y estradiol (E_2) por radioinmunoanálisis (RIAs). Observan que la teca interna sintetiza progesterona y poca testosterona, mientras que 17β -estradiol no es detectable; por otra parte la teca externa no produce progesterona ni testosterona sólo un poco de 17β -estradiol.

En otras investigaciones realizadas por Nitta et al. en 1993 usando técnicas inmunocitoquímicas localizan la presencia de: 17α -hidroxilasa, citocromo P450_{ccc} y aromatasa en las tecas de los folículos F1, F3 y F5, proponiendo una teoría celular múltiple en la que las células intersticiales de la teca interna producen progestinas y andrógenos y la teca externa los utiliza para producir estrógenos. Asimismo, estos autores observan que la capacidad esteroidogénica de la teca externa disminuye con la maduración del folículo.

Cuando se estimula la producción de los esteroides con LH, aumenta la producción de testosterona y progesterona por la teca interna, pero la secreción de 17β -estradiol de la teca externa aislada no aumenta. Por otra parte cuando se cultiva teca interna mas teca externa aumenta la producción de progesterona, testosterona y 17β -estradiol. Este incremento de la secreción de 17β -estradiol por la teca externa se debe aparentemente al aumento del sustrato para la producción de 17β -estradiol, por lo que se concluye que el órgano blanco de

la LH es la teca interna. Sin embargo, no está claro si existe una estimulación de LH sobre la actividad de P450_{c17} para la producción de 17 β -estradiol por la teca externa (Nitta et al., 1991).

Cuando se estudia la teca completa de los folículos pequeños de 1-10 mm de diámetro, se observa que en estos folículos la teca es mas activa que la de los folículos preovulatorios, produciendo 17 β -estradiol y androstenediona. Sin embargo, la granulosa de los folículos pequeños es inactiva en la producción de progesterona (Nitta et al., 1991a; Robinson y Etches, 1986). Se propone que los niveles basales de 17 β -estradiol en el plasma de las aves se mantienen por los folículos pequeños amarillos y el estroma ovárico (Nitta et al., 1991a). La teca de estos folículos pequeños puede transformar pregnenolona en progesterona y dehidroepiandrosterona en androstenediona.

Por otra parte la granulosa de los folículos preovulatorios se vuelve esteroidogénicamente mas activa en la producción de progesterona, en tanto que la teca baja su actividad esteroidogénica conforme el folículo se aproxima a la ovulación.

Estudios en codorniz han demostrado que la teca de los folículos pequeños tienen receptores a FSH con mayor afinidad que la de los folículos grandes, ya que el número de estos receptores disminuye con la maduración del folículo (Kikuchi et al., 1992).

En la gallina el número de receptores para FSH en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios disminuye con la madurez, mientras que la afinidad a LH aumenta con la maduración folicular (Porter et al., 1989).

Estos resultados llevan a Porter et al. (1989) a proponer un modelo tricelular de la síntesis de esteroides en aves. En éste las células de la granulosa sintetizan principalmente progesterona y cuando son estimulas con LH aumenta su producción. Las células de la teca interna utilizan esta progesterona y la biotransforman a androstenediona, pero también pueden usar el colesterol para la síntesis de androstenediona y cuando es estimulada la teca interna con LH aumenta la síntesis de androstenediona. Por otro lado, las células de la teca externa utilizan esta androstenediona para producir estrógenos (Fig. 6).

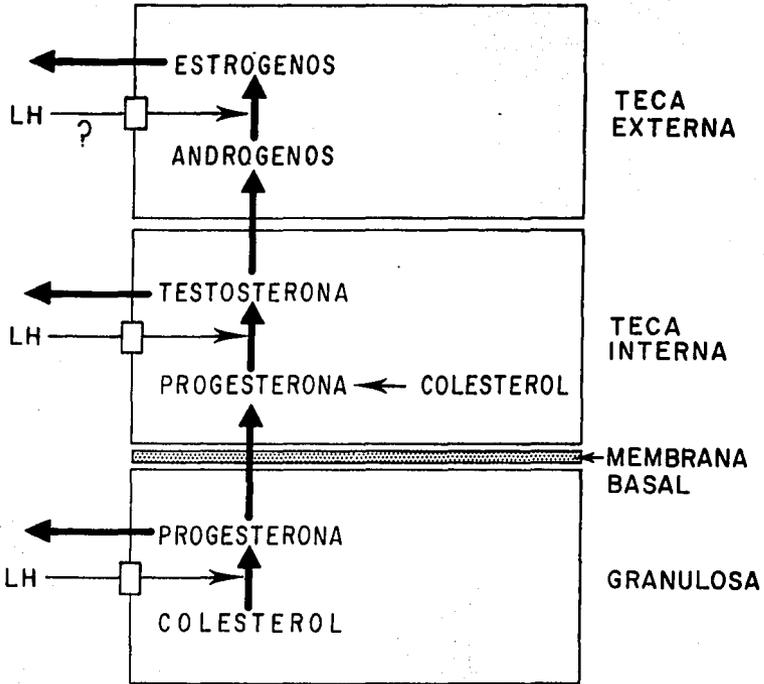


Fig. 6.- Modelo tricelular de la esteroidogénesis en los folículos preovulatorios de ave, propuesto por Porter et al., 1989.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVO

El modelo clásico bicelular de la esteroidogénesis en el ovario de aves fue propuesto por Huang et al. en 1979, donde las células de la granulosa producen progesterona y las células de la teca producen andrógenos y estrógenos. Sin embargo, la teca de los folículos preovulatorios está compuesta por dos capas; la teca interna y la teca externa (Hodges, 1974).

Porter et al. (1989) proponen un modelo tricelular de la esteroidogénesis aviar donde la granulosa secreta progesterona, la teca interna andrógenos y la teca externa estrógenos.

No obstante, no se conoce cual es la ruta metabólica para la formación de estos compuestos, ni los cambios de actividad enzimática de los esteroides durante la maduración folicular.

El objetivo del presente trabajo fue investigar el metabolismo de las hormonas esteroides por las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos preovulatorios del ovario de la gallina ponedora (*Gallus domesticus*) y la presencia de la actividad de las enzimas; 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^3 -isomerasa, 17α -hidroxilasa, $17,20$ -liasa, 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, y la aromatasa, en los distintos folículos preovulatorios de la gallina.

Interesa además evaluar los cambios que se producen en la

**actividad enzimática durante el proceso de maduración de los
diferentes folículos.**

MATERIAL Y METODOS

REACTIVOS:

Se utilizaron medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y tripsina obtenidos de Grand Island Biological Co. (Grand Island, NY); el inhibidor de tripsina, la albúmina sérica bovina (BSA), la 1-metil-3-isobutil xantina (MIX) y la gonadotropina coriónica humana (hCG), fueron adquiridas de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO). Los siguientes esteroides: 3β -hidroxi-5-pregnen-20-ona = pregnenolona (P_5), $3\beta,17\alpha$ -dihidroxi-5-pregnen-20-ona = 17α -hidroxipregnenolona ($17OHP_5$), 4-pregnen-3,20-diona = progesterona (P_4), 17α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona = 17α -hidroxiprogesteroa ($17OHP_4$), 20α -hidroxiprogesteroa ($20OHP_4$), 4-androsten-3,17-diona = androstendiona (A_4), 3β -hidroxi-5-androsten-17-ona = dehidroepiandrosterona (DHEA), 17β -hidroxi-4-androsten-3-ona = testosterona (T), 1,3,5(10)-estratrien-3-ol-17-ona = estrona (E_1), 1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol = 17β -estradiol (E_2), 5α -androstan-3,17-diona = 5α -androstandiona (5α diona), 5β -androstan-3,17-diona = 5β -androstandiona (5β diona), 5-pregnan-20 α -diona (5β -pregnan) y 5β -pregnan-3-20-diol (5β -pregdiol), se obtuvieron de Steraloids (Wilton, NH).

La cromatografía de placa fina se realizó en cromatofolios de aluminio de sílica gel G-60 con indicador fluorescente F_{254} (Merck, México). La purificación de los

precursores trititados se efectuó en cromatoplasmas de sílica gel 60 sin indicador fluorescente.

Los precursores radiactivos utilizados fueron: 7-³H(N)-pregnenolona con una actividad específica de 23.5 Ci/mmol (P₅), [1,2,6,7-³H(N)]-progesterona (94.1 Ci/mmol) (P₄), [1,2,6,7-³H(N)]-dehidroepiandrosterona de (89.80 Ci/mmol) (DHEA), androst-4-ene-3,17-diona, [1,2,6,7-³H(N)] (93 Ci/mmol) (A₄) y [1,2,6,7-³H] testosterona (105 Ci/mmol) (T), obtenidas de Du Pont Co. NEN Research Products (Boston, M.A.)

ANIMALES:

Para este estudio se utilizaron gallinas sanas de 40 a 50 semanas de edad de la raza Leghorn blanca, con un peso de 1800 gr, obtenidas de la granja Experimental Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., las cuales fueron sacrificadas por decapitación 6-8 horas después de la ovulación.

OBTENCION DE LAS CELULAS

Los folículos preovulatorios de los siguientes diámetros: F1 (3.5 ± 0.17 cm), F3 (2.5 ± 0.17 cm) y F5 (1.4 ± 0.02 cm) son recibidos en una solución amortiguadora de fosfatos libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ (PBS) en donde se les quitan las adherencias de tejido conectivo de la parte exterior del folículo y son separadas la capa de la granulosa y la teca completa de

acuerdo a la técnica descrita por Gilbert et al. (1977). Los folículos se abren a través del estigma, vertiendo el contenido folicular en una caja de Petri, en donde es separada la granulosa de la yema. La granulosa es colocada en una solución salina balanceada libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} para eliminar los residuos de yema.

La disociación enzimática de la granulosa se realizó en tripsina al 0.1% durante 7 min a 37°C . La acción de esta enzima se detiene lavando dos veces las células con inhibidor de tripsina al 0.2% y centrifugando a 800 rpm durante 10 min. para recuperar el botón celular.

Para la obtención de la teca interna se evierte el folículo, quedando expuesta la teca interna la cual se incuba en tripsina al 0.25%, diluida en una solución salina libre de Ca^{2+} Mg^{2+} , a 37°C , durante 10 min. Con ayuda de un bisturí se termina de desprender la teca interna (Porter et al., 1989). La acción de esta enzima se detiene lavando dos veces las células con inhibidor de tripsina al 0.50% y centrifugando a 800 rpm durante 10 min.

El control de la viabilidad de las células se realizó con la prueba de exclusión del azul de tripano, el cual mostró un 90% de viabilidad después de la disgregación celular.

A continuación, se incuban 5×10^5 células de las suspensiones celulares de la teca interna o de la granulosa, de los diferentes folículos. El medio de incubación DMEM es suplementado con albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1%, 0.1 mM

de metil-isobutil-xantina (MIX), gonadotropina coriónica humana (hCG) 1.0 UI/ml y 0.1 μ Ci de los diferentes precursores tritiados. El agregado de MIX y hCG se hizo para lograr la máxima estimulación de las células incubadas.

La incubación se realizó en un baño con agitación a 37° C bajo una atmósfera de CO₂ al 5% y 95% de aire, durante 7.5 y 15 min.

Los precursores radiactivos utilizados fueron: pregnenolona, progesterona, dehidroepiandrosterona, androstenediona y testosterona, la purificación de éstos se efectuó previa a la incubación, por cromatografía de capa fina.

Una vez terminado el tiempo de incubación, ésta se detiene con 10 ml de éter etílico frío, la mezcla se agita con vortex por 30 seg. Se realizan un total de 3 extracciones de los esteroides con éter etílico.

SEPARACION E IDENTIFICACION DE LOS METABOLITOS

Se utilizaron placas de aluminio de 20 x 20 cm para analizar las muestras. La cromatografía se realizó sembrando los estándares de esteroides auténticos y las muestras problema en las placas de aluminio, las cuales se desarrollaron en dos sistemas diferentes e independientes de solventes: diclorometano: acetato de etilo (8:2 v/v) y éter isopropílico: hexano: ácido acético (70:30:2.4 v/v).

Los esteroides usados como acarreadores y referencias

(estándares auténticos) fueron: pregnenolona, 17 α -hidroxipregnenolona, progesterona, 17 α -hidroxiprogesteroa, 20 α -hidroxiprogesteroa, androsterona, androstenediona, dehidroepiandrosterona, testosterona, estrona, 17 β -estradiol, 5 α -androstandiona, 5 β -androstandiona, 5 β -pregnandiona y 5 β -pregnandiol.

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

El área cromatográfica de las muestras problema se dividió en zonas que correspondían a cada estándar auténtico, se cortaron y depositaron en viales a los que se les agregó 5 ml de líquido de centelleo para ser leídos posteriormente en el contador de centelleo líquido (Beckman LS 6000).

Con base en las cuentas por minuto (cpm) obtenidas, se calculó el % de transformación para cada metabolito identificado, sintetizado por las células de la granulosa y de la teca interna.

ANALISIS ESTADISTICO

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

R E S U L T A D O S

METABOLISMO DE LAS CELULAS DE LA GRANULOSA

Las células de la granulosa de los folículos preovulatorios F1, F3 y F5 incubadas en presencia de pregnenolona tritiada como sustrato durante 15 min, produjeron como metabolito mas importante a la progesterona (P_4). El menor porcentaje de transformación lo encontramos en F5=74.9% y aumenta significativamente ($P < 0.05$) hacia el F1= 91.52%. Otro de los metabolitos producidos con este sustrato fue la 5 β -pregnandiona con un 3.75% de transformación en el folículo mas inmaduro (F5), disminuyendo la transformación hacia el folículo mas maduro (F1) (Tabla 1).

Cuando se utilizó dehidroepiandrosterona (DHEA) como precursor, la biotransformación fue a androstenediona (A_4) con los siguientes porcentajes de transformación: F1=88.16%, F3=91% y F5=79%. Por otro lado cuando incubamos con androstenediona como precursor durante 15 min, la única transformación fue a 5 β -androstandiona con un porcentaje de transformación menor al 4%.

La incubacion con testosterona como sustrato resulta en una única transformación de 4.54% a androstenediona en el F1 y menos de 1% en F3 y en F5 (Tabla 1).

METABOLISMO DE PREGNENOLONA EN LA TECA INTERNA

Las células de la teca interna de los folículos

TABLA 1

Metabolismo de pregnenolona, dehidroepiandrosterona, androstenediona y testosterona por las células de la granulosa de los folículos preovulatorios, en 15 min de incubación.

SUSTRATO/ metabolitos	PORCENTAJES DE TRANSFORMACION EN LOS FOLICULOS		
	F1	F3	F5
PREGNENOLONA			
17OHP5	0.47± 0.15	0.49± 0.19	nd
P4	91.52± 0.10 ^a	87.83± 2.35 ^b	74.92± 10.6 ^c
5β-Pregna	1.12± 0.15 ^a	1.81± 0.06 ^a	3.75± 1.30 ^b
Remanente	7.00	9.9	21.3
DHEA			
A4	88.16± 1.15	91.00± 0.01	79.00± 10.7
5βandrostan	0.52± 0.10	0.44± 0.21	1.95± 0.95
Testos	0.93± 0.17	0.99± 0.23	nd
Remanente	10.39	7.57	19.05
ANDROSTENEDIONA			
5β-androsta	2.95± 0.06	4.00± 0.60	3.80± 0.84
Testos	0.67± 0.05	0.42± 0.03	0.43± 0.05
Remanente	96.38	94.66	95.77
TESTOSTERONA			
A4	4.54± 0.28	0.84±0.24	0.36± 0.40
Remanente	95.46	99.16	99.64

Sistema utilizado diclorometano: acetato de etilo 8:2 v/v.

Los valores representados son el promedio ± la desviación estándar de n=3 en pregnenolona y n=2 de los andrógenos.

nd, indica no determinado

Los superíndices a,b,c, indican los valores estadísticamente diferentes (P < 0.05) entre los distintos folículos preovulatorios, para un mismo metabolito.

preovulatorios F1, F3 y F5 al ser incubadas durante 7.5 y 15 min en presencia de pregnenolona tritlada, produjeron en diferentes porcentajes los siguientes metabolitos: 17α -OHP₅, 17α -OHP₄, P₄, 5 β -pregnandiona, DHEA, A₄ y un metabolito no identificado. La producción de estos metabolitos es mayor a los 15 min (Tabla 2).

La biotransformación hacia progesterona es similar en los tres folículos estudiados, sin observarse cambios significativos en los dos tiempos usados, en tanto que los porcentajes de transformación de 17α -hidroxiprogesterona (17α OHP₄) y androstenediona (A₄) durante los 7.5 min de incubación aumentan hacia el folículo F5, encontrándose cambios significativos en la producción de A₄ ($P < 0.05$) entre los folículos F1 y F5 cuando se usa el sistema de corrimiento de éter isopropílico: hexano: ac. acético 7:3:0.2 v/v (Fig 7).

El mayor porcentaje de transformación a A₄ durante los 7.5 min de incubación lo encontramos en el folículo F5 en los dos sistemas de corrimiento utilizados teniendo cambios significativos ($P < 0.05$) entre los folículos F1 y F5. Cuando se usa el sistema de corrimiento éter isopropílico la biotransformación a 17α -OHP₄ siempre fue mayor que a 17α -OHP₅ en los folículos utilizados; la transformación a DHEA fue menor que 3.3%. El metabolito no identificado tiene un porcentaje de transformación promedio de 9.5% en los folículos analizados y no presenta cambios significativos (Tabla 2).

TABLA 2

Metabolismo de pregnenolona por las células de la teca interna de los folículos preovulatorios incubados durante 7.5 y 15 min (0) de incubación.

SUSTRATO/ metabolitos	PORCENTAJES DE TRASFORMACION EN LOS FOLICULOS		
	F1	F3	F5
PREGNENOLONA*			
P4	10.43± 1.59 ^a	12.01± 0.30 ^a	11.04± 2.81 ^a
17OHP4	5.20± 2.23 ^a	9.72± 6.10 ^a	18.61± 11.9 ^a
A4	3.84± 2.61 ^a	3.41± 2.02 ^{ab}	13.42± 2.10 ^b
?	3.86± 2.65 ^a	4.02± 1.87 ^a	4.31± 2.48 ^b
5β-PREGN	0.64± 0.33	0.61± 0.32	0.43± 0.03
Remanente	73.76	62.28	43.97
PREGNENOLONA**			
17OHP5	0.90± 1.28 ^a	1.25± 1.76 ^a	1.60± 2.26 ^a
P4	15.14± 0.33 ^a	18.49± 3.14 ^a	20.45± 4.17 ^a
17OHP4	0.99± 0.15 ^a	2.98± 0.89 ^{ab}	7.85± 2.37 ^b
DHEA	2.18± 0.10 ^a	2.58± 1.86 ^a	3.95± 2.95 ^a
A4	2.58± 0.82 ^a	6.55± 0.63 ^b	17.38± 0.23 ^c
?	4.51± 1.07 ^a	5.95± 1.53 ^a	6.54± 1.47 ^a
Remanente	73.70	62.20	42.23
PREGNENOLONA*O			
17OHP5	9.45± 2.68 ^a	11.19± 3.12 ^a	14.33± 8.37 ^a
P4	10.39± 2.72 ^a	7.49± 4.02 ^a	5.06± 3.59 ^a
17OHP4	11.65± 3.96 ^a	11.95± 2.79 ^a	14.29± 8.62 ^a
A4	17.43± 17.5 ^a	30.23± 26.5 ^a	22.90± 22.0 ^a
?	11.70± 8.67 ^a	7.34± 4.46 ^a	10.94± 9.03 ^a
5β-Pregn	1.98± 1.10 ^a	1.83± 0.97 ^a	nd
Remanente	37.40	29.97	32.48
PREGNENOLONA**O			
17OHP5	2.58± 1.84 ^a	1.63± 1.37 ^a	1.36± 1.12 ^a
P4	15.17± 7.15 ^a	13.06± 8.91 ^a	16.38± 9.39 ^a
17OHP4	4.80± 2.35 ^a	9.87± 5.41 ^a	8.75± 4.75 ^a
DHEA	2.42± 2.94 ^a	1.64± 2.41 ^a	3.32± 3.92 ^a
A4	19.49± 17.4 ^a	38.18± 16.3 ^a	31.41± 10.5 ^a
?	12.91± 9.96	8.72± 5.66	10.73± 5.10
Remanente	42.63	26.91	28.07

* Sistema usado diclorometano: acetato de etilo 8:2 v/v.
 ** éter isopropílico: hexano: ac. acético 7:3:0.2 v/v. Los superíndices a,b,c indican los valores estadísticamente diferentes (P < 0.05) entre los distintos folículos preovulatorios, para un mismo metabolito.

De los esteroides reducidos a partir de pregnenolona en la teca interna encontramos 5 β -pregnandiona cuando se usa el sistema de diclorometano: acetato de etilo. El porcentaje de transformación fue similar en los tres folículos estudiados (1.98%) y no se presentan diferencias significativas entre ellos.

Los metabolitos no identificados corren con $R_f=0.090$ en nuestro sistema de diclorometano: acetato de etilo (8:2 v/v) y con un $R_f=0.075$ en el sistema de éter isopropílico: hexano: ac. acético (7:3:0.2 v/v) presentando un aumento significativo ($P < 0.05$) entre el folículo F1 y el folículo F5 (Tabla 2).

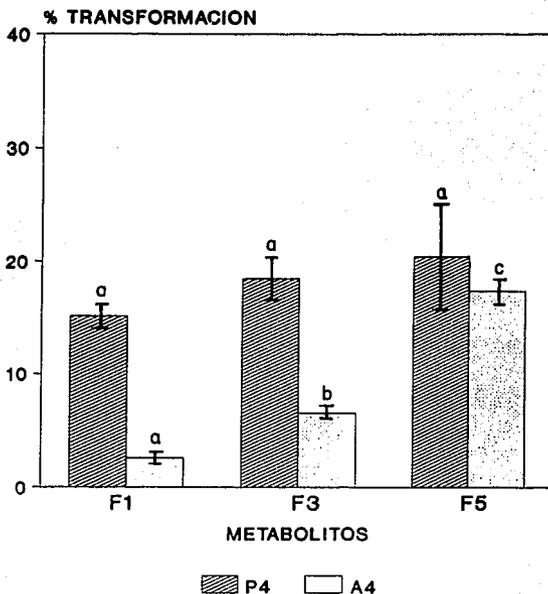
METABOLISMO DE PROGESTERONA EN LA TECA INTERNA

Utilizando progesterona como precursor durante 15 min de incubación el metabolito que encontramos en mayor proporción es A₄, y la acumulación de este metabolito es significativamente mayor ($P < 0.05$) en el folículo más inmaduro (F5) que en el maduro (F1). La producción de 5 β -pregnandiona es menor en el folículo F5 presentando un cambio significativo ($P < 0.05$) entre F1 vs F5 en los dos sistemas de separación utilizados (Tabla 3) (Fig 8).

La biotransformación de 17 α -OHP₄ se mantiene en los tres folículos revisados y no presentan cambios significativos entre ellos.

Del metabolito no identificado el mayor porcentaje de transformación lo tenemos en F3 (3.73%), presentando un cambio

METABOLISMO P5 (7.5 min) TECA INTERNA



Remanente P5: F1•73.7, F3•62.2, F5•42.2

Fig. 7.- Principales metabolitos obtenidos a partir de pregnenolona al incubar las células de la teca interna de los folículos preovulatorios F1, F3 y F5 durante 7.5 min. Las barras representan el promedio \pm la SD, de (n=3). El sistema de solventes empleado en la TLC fue éter isopropílico: hexano: ácido acético 7:3:0.2 v/v/v. Los barras con la misma letra no presentan diferencias significativas para un mismo metabolito.

TABLA 3

Metabolismo de progesterona por las células de la teca interna de los folículos preovulatorios en 15 min de incubación.

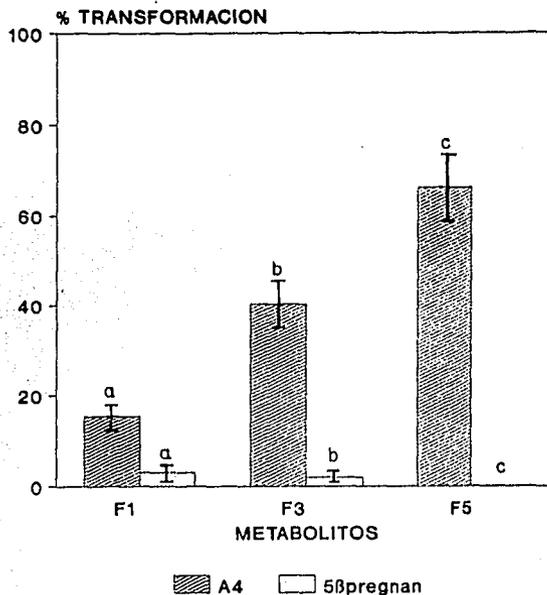
SUSTRATO/ metabolito	PORCENTAJES DE TRANSFORMACION EN LOS FOLICULOS					
	F1		F3		F5	
PROGESTERONA*						
17OHP4	15.13±	2.69 ^a	23.30±	2.51 ^a	21.60±	8.17 ^a
A4	15.18±	2.20 ^a	36.71±	7.02 ^b	49.50±	8.56 ^c
5 β -Pregn	8.93±	4.63 ^a	2.43±	1.68 ^b	0.88±	0.11 ^c
Testo	2.45±	1.54 ^a	2.55±	1.09 ^a	2.40±	1.23 ^a
?	1.26±	0.11 ^a	1.40±	0.15 ^a	1.98±	0.99 ^a
Remanente	67.00		33.61		23.55	
PROGESTERONA**						
17OHP4	10.80±	2.70 ^a	19.41±	3.39 ^a	14.11±	5.21 ^a
A4	15.70±	6.80 ^a	40.40±	7.20 ^b	66.20±	9.00 ^c
5 β -Pregn	13.07±	8.93 ^a	2.51±	0.61 ^b	0.25±	0.02 ^c
?	1.65±	0.77 ^a	3.73±	0.22 ^{ab}	3.26±	0.70 ^b
Remanente	58.50		33.95		22.18	

*Sistema usado diclorometano: acetato de etilo 8:2 v/v

** éter isopropílico: hexano: ac. acético 7:3:0.2 v/v/v.

Los superíndices a,b,c, indican los valores estadísticamente diferentes (P < 0.05) entre los distintos folículos preovulatorios, para un mismo metabolito.

METABOLISMO P4 (15 min) TECA INTERNA



Remanente P4: F1=57.3, F3=30.5, F5=19.02

Fig 8.- Principales metabolitos obtenidos a partir de progesterona al incubar células de la teca interna de los folículos preovulatorios F1, F3 y F5 durante 15 min. Las barras representan el promedio \pm la SD, de (n=4). El sistema de solventes empleado en la TLC fue éter isopropílico: hexano: ac. acético 7:3:0.2 v/v/v. Los barras con las mismas letras no presentan diferencias significativas para un mismo metabolito.

significativo ($P < 0.05$) entre el folículo F1 y el folículo F5 (Tabla 3).

METABOLISMO DE DEHIDROEPIANDROSTERONA EN LA TECA INTERNA

Al utilizar DHEA como sustrato el metabolito que se produce en mayor cantidad es A_4 con un porcentaje de biotransformación de $F1=64.23$, $F3=77.18$ y $F5=80.85$ mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en los porcentajes de transformación de F5 vs F1, de F3 vs F1 y F5 vs F3 (Tabla 4 y Fig. 9).

La 5β -androstandiona también es detectada a partir de DHEA y el mayor porcentaje lo encontramos en $F1=5.44$ y disminuye hacia el folículo más joven (F5) mostrando diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los folículos F1 vs F5 (Fig. 9 y Tabla 4).

Otros metabolitos que también son detectados a partir de DHEA son: 5β -androstandiol y testosterona con 1.0% y 0.5% de transformación, respectivamente (Tabla 4).

METABOLISMO DE ANDROSTENEDIONA EN LA TECA INTERNA

Al incubar las células de la teca interna en presencia de androstenediona durante 15 min, el folículo F5 es el que tiene menor actividad metabólica, el remanente fue de 98.41%.

La mayor actividad la tiene el folículo F1 siendo capaz de transformar A_4 en 5β -androstandiona (5β -andros) con un 5.3% presentado cambios significativos ($P < 0.05$) entre F1 vs F5

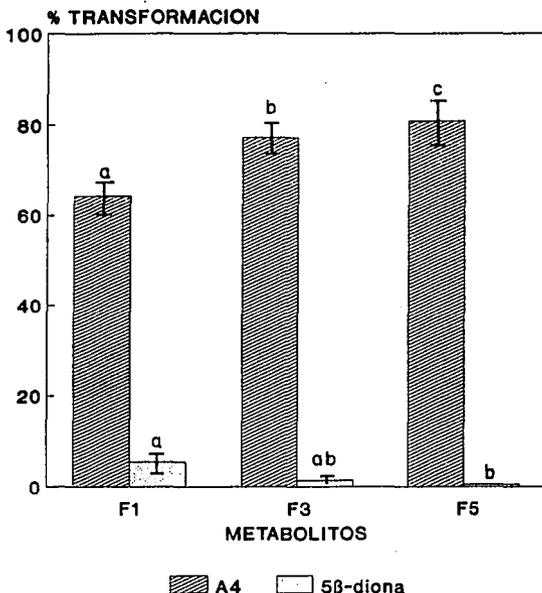
TABLA 4

Metabolismo de dehidroepiandrosterona, androstenediona y testosterona por la teca interna de los folículos preovulatorios durante 15 min de incubación.

SUSTRATO/ metabolito	PORCENTAJE DE TRANSFORMACION EN LOS FOLICULOS		
	F1	F3	F5
DHEA*			
A4	64.23± 6.17 ^a	77.18± 3.81 ^b	80.85± 7.60 ^c
5β-diona	5.44± 3.62 ^a	1.46± 1.06 ^{ab}	0.50± 0.33 ^b
Testo	0.74± 0.49 ^a	0.36± 0.13 ^a	0.46± 0.27 ^a
?	2.48± 1.99	2.06± 0.85	3.71± 2.66
Remanente	27.19	18.94	14.48
A4*			
Testo	0.51± 0.59 ^a	0.41± 0.29 ^a	0.63± 0.54 ^a
5β-diona	5.28± 3.87 ^a	2.64± 1.74 ^a	0.50± 0.10 ^b
?	2.76± 3.91 ^a	0.41± 0.39 ^a	0.46± 0.35 ^a
Remanente	91.45	96.54	98.41
TESTO*			
A4	6.79± 3.45 ^a	11.87± 5.31 ^a	12.61± 5.22 ^a
5β-diona	0.42± 0.33 ^a	0.30± 0.41 ^a	0.26± 0.23 ^a
?	3.11± 0.64	1.90± 1.46	1.13± 1.02
Remanente	89.68	85.93	86.0

* Sistema usado diclorometano: acetato de etilo 8:2 v/v.
Los superíndices a,b,c indican los valores estadísticamente diferentes (P < 0.05) entre los distintos folículos preovulatorios, para un mismo metabolito.

METABOLISMO DHEA (15 min) TECA INTERNA



Remanente DHEA: F1=23.9, F3=18.2, F5=14

Fig 9.- Principales metabolitos obtenidos a partir de dehidroepiandrosterona al incubar las células de la teca interna de los folículos preovulatorios F1, F3 y F5, durante 15 min. Las barras representan el promedio \pm SD de (n=4). El sistema de solventes empleado en la TLC fue diclorometano: acetato de etilo 8:2 v/v. Las barras con la misma letra no presentan diferencias significativas para un mismo metabolito.

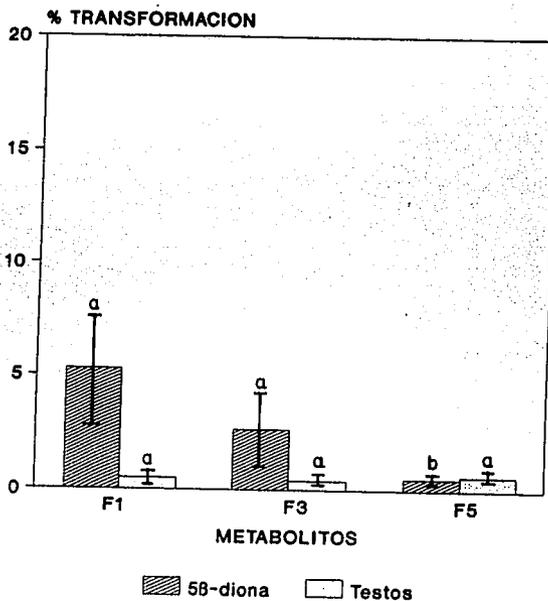
(Fig. 10 y Tabla 4). Al aumentar el tiempo de incubación a 30 min el folículo F1 aumenta la producción de 5 β -androstendiona a 13.6% de transformación (este resultado no está incluido en las tablas).

La actividad metabólica de testosterona (T), y el metabolito no identificado (?) también son detectados con una transformación menor de 3% (Tabla 4).

METABOLISMO DE TESTOSTERONA EN LA TECA INTERNA

Después de incubar la teca interna de cada uno de los folículos preovulatorios en presencia de testosterona tritiada, el metabolito aislado en mayor porcentaje en los tres tipos de folículos después de los 15 min de incubación fue androstenediona (F1=7.4%, F3=12% y F5=12.6%), sin presentar cambios significativos entre ellos. Un metabolito no identificado con un $R_f=0.050$ en el sistema de diclorometano: acetato de etilo fue detectado con un promedio de 2% de transformación en los tres folículos estudiados (Fig 11 y Tabla 4).

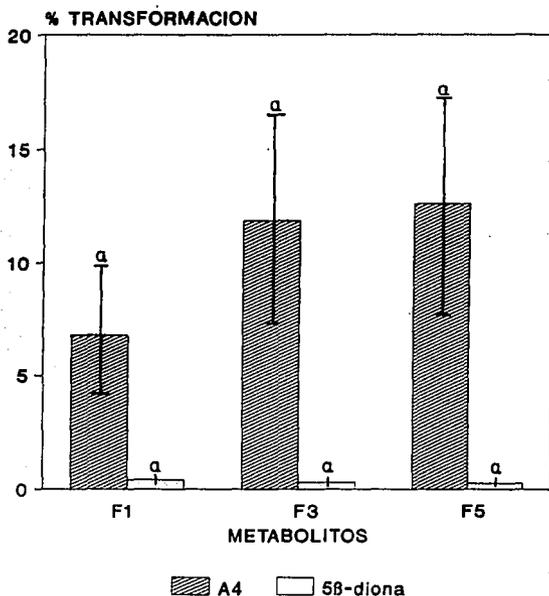
METABOLISMO A4 (15 min) TECA INTERNA



Remanente A4: F1=89.6, F3=95.2, F5=96.5

Fig 10.- Principales metabolitos obtenidos a partir de androstenediona al incubar células de la teca interna de los folículos preovulatorios F1, F3 y F5 durante 15 min. Las barras representan el promedio \pm DS de (n=4). El sistema de solventes utilizado en la TLC fue diclorometano: acetato de etilo 8:2 v/v. Los barras con la misma letra no presentan diferencias significativas para un mismo metabolito.

METABOLISMO TESTOS (15 min) TECA INTERNA



Remanente TESTO:F1=89.4, F3=85.7, F5=86

Fig.11.- Principales metabolitos obtenidos a partir de testosterona al incubar las células de la teca interna de los folículos preovulatorios F1, F3 y F5 durante 15 min. Las barras representan el promedio \pm SD de (n=4). El sistema de solventes utilizado en la TLC fue diclorometano: acetato de etilo 8:2 v/v. Los promedios con la misma letra no presentan diferencias significativas para un mismo metabolito.

DISCUSION

Las células de la granulosa de los folículos preovulatorios de la gallina doméstica son un modelo ideal para el estudio de la diferenciación funcional y el metabolismo de los esteroides. Durante el desarrollo folicular las células de la granulosa forman una capa simple y están unidas por desmosomas. Con la metodología de separación utilizada, estas células se obtienen con un 100% de pureza.

En este estudio observamos que la progesterona es el principal producto de biosíntesis de las células de la granulosa de ovario de gallina a partir de pregnenolona. Esto demuestra que la actividad enzimática de 3β -HSD está presente y aumenta con la maduración folicular.

En nuestros resultados, androstenediona es sintetizada en altas cantidades a partir de DHEA por las células de la granulosa, manteniéndose esta síntesis durante la maduración folicular, lo que reafirma la actividad de la 3β -HSD como la principal enzima de estas células.

Esto concuerda con los estudios que demuestran que las células de la granulosa secretan principalmente progesterona (P_4) durante la maduración folicular (Wells et al., 1981; Marrone y Hertelendy, 1983a). Además, como vamos a comentar mas adelante, en la granulosa se sintetizan otras progestinas así como pequeñas cantidades de andrógenos, pero no estrógenos (Marrone y Hertelendy, 1983; Wiebe et al.,

1990).

Cuando las células de la granulosa son estimuladas con la hormona luteinizante (LH), o con adenosin monofosfato 3'5' cíclico (AMPC) aumenta la síntesis de progesterona (Marrone y Hertelendy, 1983b, 1985; Asem y Hertelendy, 1985; Johnson, 1994). Además la actividad de la enzima 3 β -HSD aumenta con la maduración folicular (Marrone y Sebring, 1989).

La 5 β -pregnan-3-20 diona es producida por las células de la granulosa a partir de P5 en pequeñas cantidades, indicándonos la presencia de la enzima 5 β -reductasa en los folículos preovulatorios. El mayor porcentaje de transformación a 5 β -pregnan-3-20-diona lo tenemos en el folículo F5 y disminuye en el F1. Esto coincide con Wiebe et al. (1990) quienes reportan la producción de este mismo metabolito a partir de progesterona en la granulosa. Sin embargo, la comparación del porcentaje de transformación obtenido por este autor con nuestros resultados es difícil porque sus datos son luego de cuatro días de incubación. La biotransformación a 5 β -androstandiona a partir de DHEA como sustrato la encontramos únicamente en el folículo F5=1.95%, lo que implica una actividad baja de la enzima 5 β -reductasa en las células de la granulosa en tiempos cortos de incubación. Asimismo, la síntesis de 5 β -androstandiona como el único compuesto a partir de A₄ con un 3% de promedio en las células de la granulosa de los folículos estudiados,

nos confirma la actividad enzimática de 5 β -reductasa.

Cuando investigamos el metabolismo de las células de la granulosa con testosterona como sustrato durante 15 min, tenemos una biotransformación a androstenediona en el folículo F1 de un 4.54% y de menos de 1% en los otros folículos, estos resultados indican la participación de la enzima 17 β -HSD con una actividad reducida. La misma enzima se revela menos activa cuando se explora a partir de A₄, por lo tanto la actividad de 17-HSD en nuestras condiciones es poco importante y actúa preferencialmente en sentido oxidativo.

Con los resultados obtenidos concluimos que las células de la granulosa de los folículos preovulatorios de gallina presentan actividad de: 3 β -HSD, 17-HSD, y 5 β -reductasa.

Al comparar la actividad de 3 β -HSD con la 17-HSD y la 5 β -reductasa en las células de la granulosa, tenemos que la principal actividad se encuentra en la enzima 3 β -HSD con la producción de progesterona como el metabolito mas importante. La progesterona juega un papel fisiológico en la regulación de la ovulación de la gallina doméstica. Unas horas antes de la ovulación, los niveles plasmáticos de P₄ y LH aumentan simultáneamente (Weibe, 1990). La actividad de la 5 β -reductasa y la 17 β -HSD en las células de la granulosa es menor y su importancia fisiológica se desconoce.

La separación de las tecas interna y externa requiere de un tratamiento mecánico-enzimático. Las células de la

teca interna se obtuvieron evertiendo el folículo y exponiendo la teca interna a una digestión enzimática. Sin embargo, con la prueba de viabilidad celular mostramos que el procedimiento utilizado no afecta a las células ni su funcionamiento ya que son capaces de metabolizar los distintos precursores agregados al medio. Esta técnica de separación ha sido utilizada por otros autores y ha sido validada con estudios morfológicos (Porter, et al., 1989; Nitta et al., 1991).

Cuando las células de la teca interna son incubadas durante 7.5 min con pregnenolona como sustrato, los metabolitos obtenidos nos muestran la actividad de las siguientes enzimas: 5 β -reductasa, P450_{C17} (17 α -hidroxilasa y 17,20-liasa) y 3 β -HSD, esta última enzima es la más activa.

Al comparar la actividad de 3 β -HSD, por los porcentajes de transformación obtenidos durante los dos tiempos estudiados, tenemos que la pregnenolona remanente difiere en ambos tiempos, observando una mayor biotransformación a los 15 min que a los 7.5 min, lo que corrobora la actividad enzimática.

Por otro lado, al comparar la capacidad de metabolizar P₅ por las células de la teca interna y las células de la granulosa, es evidente que el mayor porcentaje de transformación se observa en las células de la granulosa. Esto puede explicarse porque en el caso de la granulosa estamos en presencia de una población celular uniforme, altamente

especializada desde el punto de vista endócrino en la producción de progesterona.

Los metabolitos 17α -OHP₃ y 17α -OHP₄ son sintetizados a partir de pregnenolona, esto demuestra la actividad enzimática de 17α -hidroxilasa. De estos dos metabolitos 17α -OHP₄ tiene el mayor porcentaje de transformación en los dos tiempos utilizados. Siguiendo con la ruta metabólica el metabolito inmediato es A_4 , que es el principal producto obtenido por la teca interna indicando la actividad de la $17,20$ -liasa; las cantidades de DHEA en estos ensayos son indetectables. Estos resultados sugieren que los metabolitos 4 ene 3 ceto (via Δ_4) representan la vía preferencial en la síntesis de andrógenos en la teca interna.

Al comparar los tres folículos estudiados, la mayor actividad del complejo enzimático P450_{c17} (17α -hidroxilasa, $17,20$ -liasa) reside en el folículo mas inmaduro (F5), tal como lo muestra la producción de androstenediona, la misma decrece significativamente durante la maduración folicular. Estos datos coinciden con lo reportado por Marrone y Hertelendy (1985) que al estudiar la producción de A_4 en los folículos F3 y F4 y compararla con la del F1 observaron una reducción en la producción de A_4 con el crecimiento folicular. En el mismo sentido, Porter et al. (1991) estudiando la secreción de esteroides por la teca interna, de los folículos preovulatorios F1 y F5 en el pavo informaron que el folículo mas maduro produce menos P_4 y A_4 que el folículo F5, hecho que

concuerdar con nuestros datos.

La actividad de 5β -reductasa en la teca interna es mayor cuando usamos progesterona como sustrato que cuando utilizamos pregnenolona. Esta actividad es menor en el folículo F5 y aumenta significativamente hacia el folículo F1, es decir, está aumentando con la maduración folicular. Por otra parte, la biotransformación de A_4 a partir de DHEA disminuye significativamente durante la maduración en las células de la teca interna. Es necesario notar que lo contrario sucede con la producción de 5β -androstandiona, producto de la actividad de la 5β -reductasa que aumenta considerablemente con la maduración.

La actividad de 3β -HSD y de la $P450_{C17}$ decae con la maduración folicular, esto contrasta con el aumento de la actividad de la 5β -reductasa; estos dos fenómenos pueden relacionarse y resultar en una disminución de la producción de A_4 y en un menor aporte de andrógenos aromatizables en el folículo próximo a ovular.

Sobre los metabolitos 5β -reducidos podemos tomar en consideración dos posibilidades sobre su importancia fisiológica. Una primera posibilidad es que juegan un papel importante en la regulación de síntesis de estrógenos, secuestrando andrógenos para impedir su aromatización. La segunda es que incrementan la síntesis de ácido amino-levulínico y del grupo hemo (Inano et al., 1990). Sin embargo, Aragonés et al. (1991) plantean que en el caso de las

glándulas esteroideogénicas, como el ovario, la formación del grupo hemo probablemente contribuya mas a la síntesis del citocromo P450 que a la síntesis de hemoglobina.

La actividad de la 3β -HSD en la capa de la granulosa y la teca interna la evaluamos por la transformación de P_5 a P_4 y de DHEA a A_4 . En la granulosa el porcentaje de transformación a partir de estos dos precursores es similar, en cambio en el caso de la teca interna el porcentaje de transformación a partir de DHEA es mayor que a partir de P_5 , estos resultados nos indican la posibilidad de la existencia de isoenzimas de la 3β -HSD en los folículos preovulatorios de la gallina. Las isoenzimas son moléculas estructuralmente diferentes y tienen distinta afinidad por un mismo sustrato (Bain et al., 1991). La existencia de isoenzimas de la 3β -HSD ha sido descrita en las gónadas y la suprarrenal (3β -HSD I), en el hígado y el riñón (3β -HSD II y III) de ratón, y en la suprarrenal de humano (Cravioto et al; 1986), pero no hay información en las aves. Investigar la posibilidad de que sean isoenzimas de la 3β -HSD las que se encuentran en la capa granulosa y en la teca interna del folículo preovulatorio, requerirán de estudios de cinética enzimática.

Cuando usamos testosterona como precursor, el metabolito biotransformado en mayor cantidad es A_4 y es similar en los tres tipos de folículos. Esto es evidencia de la actividad de la 17β -HSD que funciona preferencialmente en sentido oxidativo ya que la producción de T a partir de A_4 es casi

nula. Se ha descrito que esta enzima tiene una propiedad inusual, que es la activación por producto, es decir, la testosterona promueve la formación de testosterona a partir de androstenediona así como la androstenediona hace lo mismo a partir de testosterona. La reacción es reversible y la enzima tiene dos sitios activos, esto indica que la actividad de la enzima puede ser influenciada por la disponibilidad de los sustratos (Oshima y Ochi, 1973). La mayor disponibilidad de A_4 endógena podría explicar nuestros resultados.

Androstenediona y testosterona no son aromatizadas en la teca interna, lo que sugiere que hay otro compartimiento celular que debe intervenir en la síntesis de estrógenos en las aves, tal como lo proponen Pedernera et al. (1988, 1989); Porter et al. (1989); Nitta et al. (1991).

Podemos concluir de nuestros resultados que la teca interna presenta dos actividades principales, 3β -HSD y $P450_{c17}$ (17α -hidroxilasa, $17,20$ -liasa) mientras que la 5β -reductasa y 17β -HSD son menos activas, de lo cual se infiere que A_4 es el principal producto. Esto coincide con los resultados obtenidos al medir por RIA la secreción de andrógenos por la teca completa, sin separar teca interna de teca externa (Marrone et al., 1995).

Con estos resultados, proponemos que la ruta metabólica preferencial para la biosíntesis de las hormonas esteroides por las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos preovulatorios de la gallina ponedora es la

esquematisada en la Fig 12.

Las células de la granulosa metabolizan principalmente pregnenolona a progesterona y no tienen la capacidad de producir ni andrógenos ni estrógenos.

Las células de la teca interna pueden metabolizar en menor cantidad que la granulosa, pregnenolona a progesterona y pueden utilizar esta progesterona producida por la granulosa para convertirla a androstenediona.

El predominio de la progesterona, de 17α -OHP₄ y A₄ en la teca interna sugiere que la ruta metabólica utilizada en forma preferencial es la vía de los esteroides Δ^4 .

La posibilidad de producir testosterona por la teca interna existe, pero parece ser de poca importancia. Lo mismo podemos decir sobre la producción de metabolitos 5 β -reducidos tanto a partir de andrógenos como de progestinas, lo que se observa en una magnitud reducida.

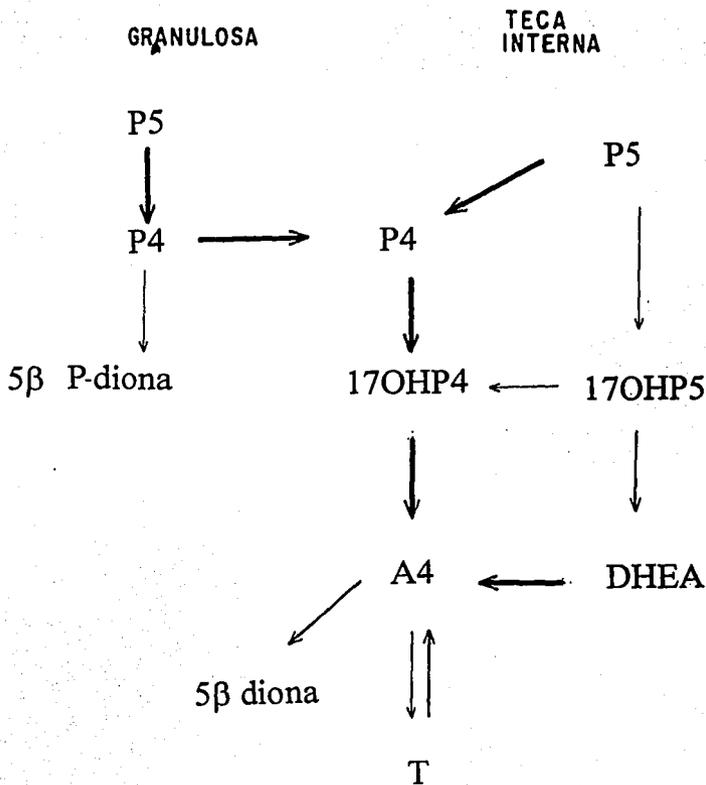


Fig. 12. Ruta metabólica de las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos preovulatorios de la gallina ponedora.

CONCLUSIONES

La progesterona es el principal metabolito producido por las células de la granulosa a partir de pregnenolona, la biosíntesis de P_4 aumenta significativamente durante la maduración, por lo que la actividad de 3β -HSD es mayor en los folículos F1.

Las células de la granulosa tienen una reducida actividad de 5β -reductasa y de 17β -HSD, siendo esta última mayor en el folículo F1.

Las células de la granulosa no tienen actividad de $P450_{c17}$ ni de aromatasas.

La actividad 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^5-4 isomerasa (3β -HSD) es la más importante en la teca interna y decrece significativamente a medida que el folículo madura.

La actividad del citocromo $P450_{c17}$, enzima de alta actividad en las células de la teca interna, disminuye significativamente con la maduración folicular.

Las células de la teca interna tienen una pequeña actividad de 5β -reductasa y esta actividad se observa mejor en los folículos más maduros.

La teca interna tiene poca actividad de 17 β -HSD y no disminuye conforme el folículo madura.

La teca interna no tiene actividad de aromatasa.

La vía preferencial para la síntesis de androstenediona sugerida para la teca interna de los folículos preovulatorios es la vía Δ^4 .

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, J.M. and Dietschy, J.M. (1978). Relative importance of high and low density lipoproteins in the regulation of cholesterol synthesis in the adrenal gland, ovary and testis in the rat. *J. Biol. Chem.* 253 9024-9030.
- Argonés, A., González, C. B., Spinedi, N. C. and Lantos, C. P. (1991). Regulatory effects of 5 β -reduced steroids. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 39, 253-263.
- Arredondo, L. C., Lemus, E., Perez-Palacios, G. (1988). Metabolismo de hormonas esteroides En: **Biología e Inmunología**. (eds Diaz-Zagoya y Hicks, G.). Vol 2. Ed Facultad de Medicina U.N.A.M. 53-92.
- Asem, E.K., and Hertelendy, F. (1985). Influence of follicular maturation on luteinizing hormone, cyclic 3'5'-adenosine monophosphate, forskolin and cholesterol-stimulated progesterone production in the hen granulosa cells. *Biol. Reprod.* 32, 257-268.
- Bahr, J.M., Wang, S. C., Huang, M.Y., and Calvo, F.O. (1983). Steroid concentration in isolated theca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen. *Biol. Reprod.* 29, 326-334.
- Bain, P.A., Yoo, M., Clarke, T., Hammond, S.H., and Payne, A.H. (1991). Multiple forms of mouse 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase and differential expression in gonads, adrenal glands, liver and kidney of both sexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8870-8874.
- Bradler, Ch. (1960). **The structure of the fowl**. Ed Oliver and Bord. Edinbough and London 111-115.
- Brodie, A.M.H. (1983). Biosynthesis, metabolism and secretion of ovarian steroid hormones En: **Comprehensive endocrinology "The ovary"**. (Serra eds) Raven Press, New York, pp 1-17.
- Brown, M.S., and Goldstein J.L. (1976). Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science.* 191, 150-157.
- Callebaut, M., Jan-Sijens, R., and Van Nassauw, L. (1990). Evolution of the avian ovarian follicle wall during its expansion. *Eur. Arch. Biol.* 101, 77-87.
- Cedard, L., Haffen, K., and Guichard, A. (1968). Influence de l'hormone gonadotrope chorionique sur la production d'oestrogenes à partir d'acetate de Na et de

dehydroepiandrosterone radioactifs par les gonades embryonnaires de poulet, cultivées in vitro. *C. R. Acad. Sci. Paris*. 267, Serie D: 118-120.

Cravioto, C. Ma., Ulloa-Aguirre, A., Bermudez, J., Herrera, J., Lisker, R. and Méndez, J.P. (1986). A new inherited variant of the 3β -hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase deficiency syndrome: Evidence for the existence of two isoenzymes. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 63, 360-367.

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

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

Farner, D. S. and King, J. R. (1973). *Avian Biology*. Vol 3. Academic Press Inc., New York. 40-65.

Gilbert, A. B. (1971a). The ovary. En "**Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl**". (J. Bell and B.M. Freeman, eds.) Vol 3. Academic Press, London and New York. 1163-1200

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

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

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

Gore-Langton, R., E. and Armstrong, D. T. (1988). Follicular steroidogenesis and its control. En: **Physiology of reproduction**. Vol 1. Ed Knobil, E., Neil, J. D. Ewing, L., Greenwald, S., and Markert, L. Raven Press. New York. 331-365.

Guichard, A., Cedard, L., Mignot, Th., 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.

Granner, D. K. (1992). Hormonas de las gónadas. En: **Bioquímica**

de Harper. Ed Manual Moderno, S.A. México, D.F. 12 ed. 526-536.

Hall, P. (1984). Cellular organization for steroidogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 86, 53-58.

Hall, P. (1986). Cytochromes P-450 and the regulation of steroid synthesis. *Steroids.* 48 (3), 131-183.

Hernández-Vértiz, A., González del Pliego, M., Velázquez, P. and Pedernera, E. (1993). Morphological changes in the thecal layer during the maturation of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 92, 80-87.

Hodges, R. D. (1974). The Female Reproductive system. En: **The histology of the fowl.** Academic Press Inc. London and New York. 326-347.

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

Huang, E. S., Kao, K. J. and Nalbandov, A. V. (1979). Synthesis of sex steroids in cellular components of chicken follicles. *Biol. Reprod.* 23, 454-461.

Huang, E. S., and Nalbandov, A. V. (1979). Steroidogenesis of chicken granulosa and theca cells: in vitro incubation system. *Biol. Reprod.* 20, 442-453.

Inano, H., Ishii-Ohba, H., Sugimoto, Y., Ohta, Y., Morikawa, T. Yoshida, M. and Tomoaki, B. (1990) Purification and properties of enzymes related to steroid hormone synthesis. *Annals of the New York academy of Sciences.* 595, 17-25.

Johnson, P.A., Stoklosowa, S. and Bahr, J. M. (1987). Interaction of granulosa and theca layer in the control of progesterone secretion in the domestic hen. *Biol. Reprod.* 37, 1149-1155.

Johnson, A. L., (1994). Regulation of hen granulosa cell differentiation and steroid production. *ARTA VI # 1,2,* 129-142.

Kimura, T. (1981). ACTH stimulation on cholesterol side chain cleavage activity of adrenocortical mitochondria. *Molec. Cell. Biochem.* 36, 105-111.

Kikuchi, M., and Ishii, S. (1992). Changes in luteinizing hormone receptors in the granulosa and theca layers of the ovarian follicle during follicular maturation in the Japanese quail. *Gen. Comp. Endocrinol.* 85, 125-137.

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

Marrone, B. L., and Hertelendy, F. (1983a). Steroid metabolism by avian ovarian cells during follicular maturation. **Biol. Reprod.** 29, 953-962.

Marrone, B. L., and Hertelendy, F. (1983b) Steroidogenesis by avian ovarian cells: effects of luteinizing hormone and substrate availability. **Am. J. Physiol.** 244, E487-E493

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

Marrone, L. B., Wiebe, P., Buckingham, K., and Hertelendy, F. (1985). Analysis of steroid metabolites produced by theca cells from the adult domestic hen. **J. Steroid. Biochem.** 23, 375-378.

Marrone, B.L., and Sebring, R. (1989). Quantitative cytochemistry of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in avian granulosa cells during follicular maturation. **Biol. Reprod.** 40, 1007-1011.

Nassauw, Van, L. H. and Callebaut, M. (1994). Contractile activity of ovarian follicle. **ARTA VI # 1,2**, 113-127

Nitta, H., Osawa, Y. and Bahr, J. M. (1991a). Immunolocalization of steroidogenic cells in small follicles of the chicken ovary: anatomical arrangement and location of the steroidogenic cells change during follicular development. **Domest. Anim. Endocrinol.** 8, 587-594.

Nitta, H., Osawa, Y. and Bahr, J.M. (1991b). Multiple steroidogenic cell populations in the thecal layer of preovulatory follicle of the chicken ovary. **Endocrinology.** 129 (4), 2033-2040.

Nitta, H., Mason, J.I. and Bahr, J.M. (1993). Localization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the chicken ovarian follicle shifts from the theca layer to granulosa layer with follicular maturation. **Biol. Reprod.** 48, 110-116.

Oshima, H., and Ochi, A. I. (1973). On testicular 17 β -hydroxy steroid oxidoreductase: product activation. **Biochim. Biophys. Acta** 306, 227-235.

Parsons, I., C. (1970). The metabolism of testosterone by early chick embryonic blastoderm. **Steroids.** 16, 59-65.

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

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**. (Hirshfield A.N. eds). Academic Press, New York, 351-355.

Perry, M. M., Gilbert, A.B. and Evans, J.A. (1978). Electron microscope observations on the ovarian follicle of the domestic fowl during the rapid growth phase. **J. Anat.** 125, (3), 481-497.

Porter, T. E., Hargis, B.M., Silsby, L. J., and Halawani, M. E. (1989). Differential steroid production between theca interna and theca externa cell: A three-cell model for follicular steroidogenesis in avian species. **Endocrinology.** 125, 109-116.

Porter, T. E., Hargis, B.M., Silsby, L. J., and Halawani, M. E. (1991). Characterization of dissimilar steroid productions by granulosa, theca interna and theca externa cell during follicular maturation in the turkey (*Meleagris gallopavo*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 84, 1-8.

Robinson, F. E. and Etches R.J. (1986). Ovarian steroidogenesis during follicular maturation in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Biol. Reprod.** 35, 1096-1105

Romanoff, A. (1960). **The avian embryo structural and functional development.** The Macmillan Company. New York. 5-61

Sharp, P. J. and Massa R. (1989). Conversion of progesterone to 5α - and 5β -reduced metabolites in the brain of the hen and its potential role in the induction of the preovulatory release of luteinizing hormone. **J. Endocr.** 86, 459-464.

Strott, C. A. (1974). Metabolism of progesterone in the chick oviduct; relation to the progesterone receptor and biological activity. **Endocrinology.** 96, 826-836.

Sturkie, P. D. (1967). Reproduction in the female and egg production En: **Avian Physiology.** (Springer-Verlag eds) 3 ed. New York. 303- 318.

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

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

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.

Tokarz, R. R. (1978). Oogonial Proliferation, Oogenesis, and Folliculogenesis in Nonmammalian Vertebrates. En: **The Vertebrate ovary**. Comparative Biology and Evolution (R. E. Jones, ed.) Plenum Press, New York and London. 145-179.

Tuckey, R. C. and Atkinson, H.C. (1989). Pregnenolone synthesis from cholesterol and hydroxycholesterols by mitochondria from ovaries following the stimulation of immature rats with pregnant mare's serum gonadotropin and human choriongonadotropin. **Eur. J. Biochem.** 186, 255-259.

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.

Wells, J.W., Dick, H.R. and Gilbert, A.B. (1981) The biosynthesis of progesterone by fowl granulosa cell in vitro from ¹⁴C labeled substrate. **J. Steroid Biochem.** 14, 651-656.

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

Wells, J.W., Marion, A., Walker, J. Culbert, J. and Gilbert, A.B. (1985). Comparison of the response "in vivo" to luteinizing hormone and follicle stimulating hormone of the granulosa of six follicle from ovarian hierarchy in the chicken (*Gallus domesticus*). **Gen. Comp. Endocrinology**. 59, 369-374.

Weniger, J.P. and Chouraqui, J. (1988). Action de LH sur la sécrétion d'oestradiol par l'ovarie embryonnaire de poulet á partir de divers precurseurs radioactifs: comparaison des taux de synthèse. **Reprod. Nutr. Dévelop.** 23, 995-1002.

Weniger, J.P., Chouraqui, J. and Zeis, A. (1989). 17 β -estradiol secretion in normal and hypophysectomized chick embryos. **Reprod. Nutr. Develop.** 29, 89-93.

Weniger, J.P., Chouraqui, J. and Zeis, A. (1991). Effect of partial decapitation (hypophysectomy) on 17 β -estradiol

secretion by the chick embryo ovary. **Differentiation**. 47, 57-59.

Wiebe, J.P., Buckingham, K. D., Zobell, L. R., and Hertelendy, F. (1990). Metabolism of progesterone by avian granulosa cells in culture. **J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.** 37, 113-120.

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

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

Woods, J. E., Scanes, C. G., Seeley, M., Cozzi, P., Onyise, F. and Thommes, R. C. (1989). Plasma LH and gonadal LH-binding cells in normal and surgically decapitated chick embryos. **Gen. Comp. Endocrinol.** 74, 1-13.

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

A N E X O S

ABREVIATURAS UTILIZADAS

I.- ESTEROIDES:

Nombre trivial	Nombre sistemático
P ₅ = pregnenolona	5-pregnen-3 β -hidroxi-20-ona
17 α OHP ₅ =17 α -hidroxipregnenolona	4-pregnen-3 β -17 α -dihidroxi- 20-ona
P ₄ = progesterona	4-pregnen-3,20-diona
17 α OHP ₄ =17 α -hidroxiprogesteronona	4-pregnen-17 α -hidroxi-3, 20-diona
5 β -pdiona = 5 β -pregnandiona	5 β -pregnan-3,20-diona
DHEA = dehidroepiandrosterona	5-androsten-3 β -hidroxi-17-ona
A ₄ = androstenediona	4-androsten-3,17-diona
5 β -diona = 5 β -androstandiona	5 β -androstan-3,17-diona
T = testosterona	4-androsten-17 β -hidroxi-3-ona
E ₁ = estrona	1,3,5,(10)-estratrien-3- ol-17-ona
E ₂ = estradiol	1,3,5 (10)-estratrien-3, 17 β -diol
? = esteroide no identificado	

II.- ENZIMAS

3 β -HSD = 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ ⁵⁻⁴-isomerasa

17 β -HSD = 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

17 α -H = 17 α -hidroxilasa

17,20-lia = 17,20-liasa

III.- OTRAS

MIX = 1-metil 3-isobutil xantina

DMEN = medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco

BSA = albúmina sérica bovina

TLC = cromatografía de capa fina

hCG = hormona gonadotropina coriónica

IV.- SOLUCIONES Y REACTIVOS

a) Solución amortiguadora de fosfatos libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺

NaCl	8.0 gr
KH ₂ PO ₄	2.0 gr
KCL	0.2 gr.
Na ₂ HPO ₄	1.15 gr
Agua bidestilada	1000 ml

b) Medio de Cultivo (DMEN) + albúmina

Medio de cultivo	10.3 gr
Albúmina bovina	1.0 gr

Agua ultrapura 1000 ml

Se ajusta el pH a 7.4 con bicarbonato de sodio al 5% y se afora a 1000 ml.

c) Tripsina al 25%

tripsina 0.062 gr

Disolver en 25 ml de solución amortiguadora de fosfatos libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺.

d) Inhibidor de tripsina al 50%

Inhibidor de tripsina 0.120 gr

Disolver en 25 ml de Demen + albúmina.

e) Líquido de Centelleo

PPO (2,5-diphenyl-oxazole) 4.0 gr

POPOP (Dimethyl popop) 0.2 gr

Tolueno 667 ml

Tritón X 100 333 ml

f) Solución azul tripano

Azul tripano 400 mg

NaCl 810 mg

KH₂PO₄ 60 mg

Metil p-hidroxibenzoato 50 ml

Agua destilada 90 ml

Calentar a punto de ebullición y enfriar a temperatura ambiente, ajustar el pH a 7.4 con NaOH 1N y ajustar el volumen final a 100 ml.