Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Regulación de hormonas esteroides y metabolismo reductivo de la progesterona durante el desarrollo embrionario en los tejidos esteroidogénicos de Gallus domesticus : Relación con la inducción de la delta-ALA-Sintetasa

González, Claudia Beatriz

1986

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
González, Claudia Beatriz. (1986). Regulación de hormonas esteroides y metabolismo reductivo de la progesterona durante el desarrollo embrionario en los tejidos esteroidogénicos de Gallus domesticus : Relación con la inducción de la delta-ALA-Sintetasa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1965_Gonzalez.pdf

Cita tipo Chicago:
González, Claudia Beatriz. "Regulación de hormonas esteroides y metabolismo reductivo de la progesterona durante el desarrollo embrionario en los tejidos esteroidogénicos de Gallus domesticus : Relación con la inducción de la delta-ALA-Sintetasa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1965_Gonzalez.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

REGULACION DE HORMONAS ESTEROIDES Y METABOLISMO REDUCTIVO DE LA PROGESTERONA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN LOS TEJIDOS ESTEROIDOGENICOS DE GALLUS DOMESTICUS. RELACION CON LA INDUCCION DE LA δ-ALA-SINTETASA

AUTOR: LIC. CLAUDIA B. GONZALEZ

DIRECTOR: DRA. ALCIRA ARAGONES

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

-1965-
Ej: 3

PROGRAMA DE REGULACION HORMONAL Y METABOLICA - CONICET

1986

"...From the very beginning of our knowledge of embryology, the avian embryo has occupied a unique position among the higher vertebrates. It has an extra-uterine existence-all its requeriments, except oxygen, are provided within the egg, which is by far the most self-contained organism, and is capable of developing in a terrestrial environment. Also, because of its universal availability, it undoubtedly has been an object of embryological observations from earliest historical time..."

"...Desde los albores de nuestro conocimiento de la embriología, el embrión de las aves ha ocupado una posición única entre los vertebrados superiores. Posee una existencia extrauterina. Todos sus requerimientos, excepto los de oxígeno, se hallan disponibles dentro del huevo, es el organismo con más contenido propio de los que se desarrollan en un entorno terrestre. Asímismo, debido a su disponibilidad universal, el huevo ha sido objeto de observaciones embriológicas desde remotos tiempos históricos..."

ALEXIS L. ROMANOFF
EN"THE AVIAN EMBRYO" 1960

a la memoria de mis padres.

a nuestra nenita.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Dr. Carlos P. Lantos, por sus valiosos conocimientos, su apoyo incondicional y colaboración en la realización de este trabajo.

A la Dra. Alcira Aragonés, por su colaboración y dirección en las tareas de esta tesis.

Al Profesor Dr. Eduardo H. Charreau, por su constante estímulo, su amable atención y su don de gente.

A Pancho, por su claridad, inestimable colaboración y amistad.

A Nora Ceballos, Silvia Bi[illegible] Eduardo Cánepa y Eduardo Cozza, por su agradable compañerismo y amistad.

A mis compañeros de laboratorio, por su comprensión y por estar.

A mis antiguos y nuevos compañeros de Química Biológica, por colaborar en la docencia y hacer más fácil el desarrollo de esta tarea.

A Ana R. Charreau por tener siempre una respuesta.

A los chicos del laboratorio del Dr. Charreau y la gente del IBYME en general, por hacer placentera mi estancia alli.

A Eduardo Cozza por las determinaciones de H.P.L.C.

A Violeta Chiauzzi por las determinaciones de RIA.

A Ana S. Haedo por el desarrollo de los métodos es-

tadísticos.

Al Dr. Horacio A. Sancovich, por las determinaciones de δ-Ala-S.

Al Dr. Brian K. Follet, por las determinaciones de RIA homólogo.

Al grupo de Embriología, por el préstamo de libros y evacuaciones de consultas.

A María Delia Pagés de Juan, por el pasaje de esta tesis a máquina.

A María E.O. de Bedners, por su asistencia técnica.

A Norma Nazar, por su ayuda incondicional.

Al Sr. Desimone, la gente de Mantenimiento en general por su rápida y eficaz colaboración.

Al Sr. Alonso, por su amabilidad y continua provisión de embriones.

En general a todos aquellos que hicieron posible la realización de esta tarea.

Al CONICET y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por el apoyo económico.

Abreviaturas

A	Androstenodiona 4-Androsten-3,20-diona.
δ-Ala-S	δ-Ala-Síntetasa Acido δ-Aminolevulinilico Sintetasa.
ACTH	Adrenocorticotrofina.
ALDO	ALDOSTERONA Δ4-pregnen-18al-11β,21 diol-3,20 diona.
AMP_c	3',5' Adenosina monofosfato cíclico.
A/B CIS	5β-P 5β-Pregnanodiona.
A/B TRANS	5α-P 5α-Pregnanodiona.
ATP	Adenosina trifosfato.
3βOH-EDH	3β-Hidroxi Esteroide Dehidrogenasa.
11βOH-Pg	11β-Hidroxi Progesterona.
B	Corticosterona Δ4-pregnon, 11β, 21-diol-3,20 diona.
BSA	Albúmina Sérica Bovina.
CNK	Cianocetona 2α-ciano-17βOH 4,4,17 TRIMETIL-ANDROST-5-EN-17βOL-3 CETONA)
CPM	Cuentas por minuto.
Ci	Curie.
μCi	Micro curie.
^{14}C	Carbono 14.
CM-Celulosa	Carboximetil celulosa.
DHA	Dehidroepiandrosterona Δ5-androsten-3βol-17 ona.
11 DOC	DOC Desoxicorticosterona Δ4-pregnen, 21 ol 3,20 diona.
$17\beta\text{-}E_2$	E_2 Estradiol 1,3,(5-10) Estratrien-3,17β-diol.
E_1	Estrona 3-OH-1,3,5(10)-estratrien-17 ona-
FSH FSH_m FSH_o FSH_a	Hormona folículo estimulante (de mamífero, ovina, ave...).
F	Cortisol 11β,17α,21-trihidroxi pregnen-4 ene-3,20 diona.
GH GH_a	Hormona de crecimiento (de ave,...).
^3H	Tritio.
18HO-B	18-Hidroxicorticosterona.
17HO-Pg	17-Hidroxi Progesterona 17α-ol-4-Pregnen-3,20-Diona.
Hb	Hemoglobina.
LH LHm LHo LH_a	Hormona Luteinizante (mamífero, ovina, ave...).
MSH	Melanotrofina.
OI	Ovario izquierdo.
OD	Ovario derecho.

P			Pregnenolona 3β-ol-5-Pregnen-20-Ona.
PRL			Prolactina.
PBS			Buffer fosfo-salino.
Pg			Progesterona 4-Pregnen-3,20-diona.
SPNL			Espirolactona 3-(3-OXO-7α-ACETILTIO-17β-HIDROXI-4 ANDROSTEN-17α-IL) ACIDO PROPIONICO γ-LACTONA.
T			Testosterona 17β-ol-4-androsten-3-ona.
TRIS			Tri (Hidroxi-Metil)-Aminometano.
TCA			Acido tricloroacético.
TSH	TSHm	TSHa	Tirotrofina (mamífero, ave...).

INDICE

	Página
- INTRODUCCION GENERAL A LOS OBJETIVOS DE ESTA TESIS	1
- ORGANIZACION DE LA TESIS	6
- CAPITULO I:	
"EMBRIOGENESIS Y SISTEMA ENDOCRINO DE POLLO"	8
1) El embrión de pollo.	13
2) La hipófisis.	32
3) El ovario.	40
4) La suprarrenal.	49
- CAPITULO II:	
"SINTESIS, SECRECION Y REGULACION DE HORMONAS ESTEROIDES DEL EJE OVARICO EN EL EMBRION DE POLLO HEMBRA"	55
1) Antecedentes sobre síntesis, secreción y regulación en el pollo a partir de la eclosión.	56
2) Antecedentes sobre síntesis, secreción y regulación en el embrión de pollo.	58
3) PUNTO I: Contenidos hipofisarios de LH y FSH.	65
a) Materiales y Métodos.	65
b) Resultados.	77
4) PUNTO II: Concentración Sérica de LH.	79
a) Materiales y Métodos.	79
b) Resultados.	80
5) PUNTO III: Contenido de Progesterona en ambos ovarios.	82
a) Materiales y Métodos.	82
b) Resultados.	93
6) PUNTO IV: Concentraciones séricas de Estradiol y Progesterona.	97
a) Materiales y Métodos.	97
b) Resultados.	102
7) PUNTO V: Estimulación "IN VITRO" de la síntesis de hormonas esteroides ováricas.	104
a) Materiales y Métodos.	104
b) Resultados.	107
8) CONCLUSIONES GENERALES DEL CAPITULO.	109

- CAPITULO III: Página

"ESTEROIDOGENESIS EN ADRENAL Y RELACION ENTRE EL METABOLISMO REDUCTIVO DE LA PROGESTERONA Y LA SINTESIS DEL HEMO EN AMBOS TEJIDOS ESTEROIDOGENICOS DEL POLLO".

1) Esteroidogénesis adrenal. 116
2) Metabolismo Reductivo de la Progesterona. 117
3) Biosíntesis del hemo. 120
4) PUNTO I: Contenido de Progesterona en la adrenal. 128
   a) Materiales y Métodos. 128
   b) Resultados. 131
5) PUNTO II: Metabolismo de la Progesterona en tejidos esteroidogénicos e hígado. 133
   a) Materiales y Métodos. 133
   b) Resultados. 147
6) PUNTO III: Actividad de la δ-Ala-S en tejido esteroidogénico e hígado. 161
   a) Materiales y Métodos. 161
   b) Resultados. 167
7) PUNTO IV: Inhibición de la actividad de la δ-Ala-S en adrenal, como consecuencia de la inhibición de la esteroidogénesis por la cianocetona y espironolactona y restitución de dicha actividad por 5β-pregnanodiona. 174
   a) Breve introducción. 174
   b) Materiales y Métodos. 175
   c) Resultados. 183
8) CONCLUSIONES GENERALES DEL CAPITULO 186

- DISCUSION GENERAL 199

- CONCLUSIONES GENERALES 210

- REFERENCIAS 212

INTRODUCCION GENERAL A LOS OBJETIVOS DE ESTA TESIS

El tema de esta tesis obliga a tener en cuenta dos conceptos relativamente recientes en biología de la regulación humoral que al tiempo de dar una visión más generalizada, por ende integrativa, de los fenómenos hasta ahora observados, permiten esbozar hipótesis funcionales acerca de algunos hechos episódicos de la regulación, especialmente respecto de los picos y ritmos que se observan en la secreción de hormonas y otros factores reguladores.

La primera noción que se debe tener en claro a este respecto es que la regulación humoral, no es sólo endócrina sino que también puede ser apócrina o autócrina, entendiéndose, dentro de este esquema, por endócrina, la que se produce entre tejidos, apócrina, entre células del mismo tejido o vecinas, y por autócrina, la que ocurre en la misma célula (1) Las diferencias son, como se aprecia, bastante graduales, siendo así mismo, difícil establecer un límite entre regulación autócrina y regulación metabólica dentro de una misma célula.

El segundo concepto muy a tener en cuenta a los fines de esta tesis es el de las "fronteras móviles" de la endocrinología. Crece año a año, en efecto, el grupo de sistemas, tejidos y vías biosintéticas que demuestran ser reguladas, o por lo menos regulables, por hormonas. En general nuestro conocimiento acerca de estas relaciones empieza por la me

dicina. Un ejemplo típico lo constituye el uso terapeútico de los glucocorticoides como inmunosupresores,antileucémicos y antiinflamatorios. Después de haberlos utilizado como tales durante tres décadas, y aunque Selye (2) ya haya previsto para ellos un papel inmunosupresor fisiológico relacionándolo con el "stress", en la década del 50, sólo recientemente se postula que una de las propiedades hormonales de los glucocorticoides podría ser la que afecta el sistema linfoide y otros componentes del sistema inmunológico (3). Otro ejemplo, este más relacionado con el objeto de esta tesis, es el de la inducción de porfirinas por los metabolitos 5β reducidos de la Progesterona y de los andrógenos.

Este hecho, en efecto, se ha reconocido en clínica, (porfirias inducidas por esteroides como enfermedades ligadas a genes autosomales),(véase por ejemplo, Anderson (4) y Pfaffenberger (5)),y se ha tratado de reproducir en una variedad de sistemas experimentales tales como hígado de embrión de pollo (6), hígado de rata (7), reticulocitos de conejo (8), células de la médula ósea humana (9), etc.

A semejanza de lo ocurrido al principio con los corticoides inmunosupresores, los experimentos efectuados hasta ahora con esteroides inductores de la porfirinogénesis, utilizaron dosis altas de inductores (10). Sin embargo en este campo, a diferencia de los glucocorticoides inmunosupresores, no se ha llegado aún a la etapa de estudiar supuestas corre-

laciones fisiológicas entre 5β reducido-inductor y porfirina-inducida.

En esta tesis se ha pretendido aplicar los dos nuevos conceptos mencionados, el de la multiplicidad integrativa de la regulación y el de las fronteras móviles de la endocrinología, a un modelo clásico de la evolución ontogenética autónoma (i.e independiente del organismo materno), el embrión de pollo.

La tesis toma como eslabón de referencia de un eje regulatorio a la progesterona, investigando luego a través del desarrollo embrionario y del recién nacido los siguientes parámetros relacionados a ovarios y corteza suprarrenal: "hacia abajo", contenidos tisulares de progesterona, reducción de dicha hormona a 5β-reducidos y actividad de δ-ALA-Sintetasa(δ-ALA-S); "hacia arriba", niveles de progesterona (y de estrógenos), niveles séricos de LH, concentración pituitaria de LH y FSH.

Una hipótesis de trabajo que supone la existencia en glándulas funcionantes, del eje.....

Hipófisis
↓
Hormonas hipofisarias
↓
Progesterona
↓
5β-reducidos
↓
δ-ALA-Sintetasa

se vería apoyada por correlaciones entre perfiles de desarrollo de estos parámetros y confirmada por los clásicos experimentos fisiológicos, consistentes en la supresión de cada uno de estos supuestos eslabones, que tendría que acarrear la supresión de los supuestos eslabones-efecto. El experimento se habría de completar con el reemplazo exógeno del eslabón primario, reemplazo que tendría que redundar en la reaparición de los eslabones-efecto.

De acuerdo con este esquema y dentro de las limitaciones metodológicas de nuestro grupo de trabajo, se investigaron los siguientes parámetros:

1- Evaluación de la concentración de LH en hipófisis de embrión de pollo hembra en los estadíos de 13, 15, 17, 19 días y en recién nacidos, mediante la utilización de inmunoensayos homólogos.

2- Determinación de la concentración de FSH en hipófisis de embrión de pollo hembra, en los estadíos citados en 1.

3- Determinación de los niveles de LH en suero de embrión de pollo hembra, en los estadíos citados en 1.

4- Evaluación de los niveles de E_2 en suero de embrión de pollo hembra en los estadíos citados en 1.

5- Determinación de los niveles de progesterona en suero de embrión de pollo hembra en los estadíos citados en 1.

6- Determinación de la concentración de progesterona en adrenal, ovarios izquierdo y derecho del embrión de pollo hembra, en los estadíos citados en 1.

7- Evaluación in vitro del grado de estimulación de la secreción de progesterona y estradiol en ambos ovarios del embrión de pollo hembra, en los estadíos citados en 1.

8- Evaluación de los niveles de transformación, de progesterona a sus metabolitos 5α y 5β-pregnanodiona; en ovarios, adrenal e hígado de embrión de pollo hembra en los estadíos citados en 1.

9- Determinación de los niveles de actividad de la enzima δALA-Sintetasa, en ovarios, adrenal e hígado de embrión de pollo hembra, en los estadíos citados en 1.

10- Finalmente se suprimió, mediante inhibidores farmacológicos, la esteroidogénesis; lo que produjo una notable disminución de δALA-Sintetasa. Luego, con el agregado a modelos suprimidos de 5β-pregnanodiona, en concentraciones calculadas como fisiológicas, se logró restablecer totalmente la actividad de la δALA-Sintetasa.

ORGANIZACION DE LA TESIS

El cuerpo central de esta tesis se dividirá en tres capítulos.

En el primero de ellos se describe la "Embriogénesis y sistema endócrino del pollo". Este capítulo contiene datos acerca del desarrollo embrionario general del pollo, desde la fecundación del huevo hasta su nacimiento. Y una descripción anatómica, embriológica e histológica de las glándulas endócrinas de nuestro interés. Además contendrá la información conocida sobre maduraciones, tanto neuroendócrinas como periféricas, sobre todo, en lo que se refiere a los inicios de cada interrelación (interlocking) entre glándulas y entre glándulas y sistemas.

Toda esta información sobre el embrión de pollo ocupa este lugar, dado que en general se halla diseminada en la bibliografía disponible y no siempre con claridad cronológica.

El segundo capítulo comprende el estudio, a través del desarrollo embrionario, de la síntesis y secreción de hormonas esteroides por los ovarios del embrión de pollo y la inducción que ejerce la hipófisis sobre esa producción esteroidea.

El tercer capítulo incluye lo referente a la producción de metabolitos reducidos de la progesterona y sus relaciones con el camino metabólico del Hemo, a través de su primera

enzima, δALA-Sintetasa.

En estos dos últimos capítulos se distinguen claramente los antecedentes bibliográficos incluídos en las respectivas introducciones, de Material y Métodos, Resultados y Conclusiones propios.

CAPITULO I

"EMBRIOGENESIS Y SISTEMA ENDOCRINO DEL POLLO"

Los conocimientos actuales sobre paleontología permiten inferir que las aves se originaron hace aproximadamente doscientos millones de años, en los albores de la era mesozoica, a partir de los reptiles.

Por ese entonces, ya durante el período triásico(11) ciertos pseudosúquidos como los euparkeria (especie de lagartos pequeños, carnívoros, con extremidades anteriores más cortas que las posteriores), empezaron a evidenciar algunos rasgos esenciales de las aves, como los relacionados con la postura bípeda.

Poco más tarde, en el jurásico, las aves aparecieron en profusión, pero todavía existían en ellas una serie de caracteres reptilianos.

Ejemplo de ello lo constituyen los pequeños Archeopterix, con cola de lagarto y pico de pájaro pero con dientes; hasta los grandes Hesperornis e Ichtornis, las aves mayores que se conocen y que presentaban también dientes y vértebras bicóncavas a semejanza de los peces.

Es probable que la evolución de los reptiles hacia las aves haya obedecido a mecanismos o influencias complejas y similares, pero de otro tipo que las que determinaron la evolu

ción de los reptiles primitivos a especies o grupos más recientes, como los pterosaurios, dinosaurios o cocodrilos.

Análogamente, no obstante las evidencias de que responden a un plan u origen básico común, las aves contemporáneas presentan una gran diversidad de detalles en sus estructuras y costumbres.

La población aviaria actual reconoce una primera división en dos subclases, según la forma del esternón. Así las aves aquilladas o carinadas poseen el esternón formando una quilla o cresta central y los rátidas portan esternón liso y chato.

Estas características se relacionan con el grado de desarrollo de las alas, y, por lo tanto, con la potencialidad del vuelo del ave. Todas las aquilladas tienen alas más o menos desarrolladas y, por ello, son voladoras. Los rátidos. o de esternón liso, son, en cambio, aves corredoras como el avestruz, que tiene las alas atrofiadas.

Una clasificación más minuciosa y consienzuda subdivide al conjunto de las aves en nada menos que 40 órdenes distintas, uno de los cuales, las gallináceas, que pertenecen a la subclase de aquilladas o carinadas, será objeto a continuación de una breve descripción en particular.

Se trata de aves terrestres y granívoras (12), capaces de vuelos cortos y rápidos, algunos de cuyos rasgos estructurales son primitivos. El paladar, por ejemplo, difiere tanto

del de las aves modernas que avala este concepto.

Ambos sexos muestran con frecuencia, significativas diferencias en tamaño y plumaje.

El nido, constituído generalmente en el suelo, es simple, y los huevos, numerosos, son de color blanco liso o manchados.

Las crías se desarrollan con rapidez luego del nacimiento.

Al orden de las gallináceas pertenecen muchas especies de éxito ecológico notable con distribución universal, entre las que cabe mencionar: Gallus (gallo y gallina); Phasianus (faisan); perdix (perdiz); Lagopus (perdiz nival); Meleagris (pavo); Numida (pintada); Pavo (pavo real) y Opisthocomus (hoacín).

La especie Gallus (gallo y gallina) merece particular atención por muchas razones que van desde el significado alimenticio que tiene para el hombre, pasando por su importancia económica, dada la fácil obtención de carne y huevos, hasta llegar al potencial que representa como elemento de investigación en ciencias biológicas.

Este pequeño animal, que ofrece múltiples posibilidades de variabilidad genética, posee un tronco rígido, corto y robusto, en tanto que el cuello es largo y móvil, terminando en una cabeza redondeada y provista de un pico córneo. Los miembros pelvianos están perfectamente adaptados a la locomoción te

rrestre en tanto que los torácicos están modificados en alas. La cola es muy corta e inmediatamente debajo de ella existe una abertura cloacal transversa que es el orificio común de los aparatos digestivos urinario y reproductor.

La cresta, las barbillas y los espolones del gallo son mucho mayores que los de la gallina.

Para esta especie, el período de desarrollo embrionario hasta el nacimiento es de 21 días.

La comprensión de la embriología del pollo, se remonta a más de 2000 años.

Ya en Historia Animalium, Aristóteles, (384-322 ac) efectúa una descripción detallada del embrión de pollo.

En los inicios de la era cristiana, el erudito romano Plinio Cayo Segundo (El viejo) (23-29 d.c.) se ocupó del tema en su obra Historia Naturalis.

Varios siglos después, en el Renacimiento, el naturalista italiano Ulises Aldrovandi (1522-1619) detalló, en su Opera Omnia, los estadíos tempranos del desarrollo del embrión de pollo. Y su contemporáneo, Fabricio de Aquapendente (1537-1619), anatomista y cirujano de renombre, efectúo más aportes en su obra Formatione Ovo et Pulli.

Una generación más tarde, Marcelo Malpighi (1628 - 1694) que pasara a la inmortalidad por la descripción de los corpúsculos renales que llevan su nombre, contribuyó también a la comprensión del tema a través de su De Formatione Pulli in

Ovo y de Ovo Incubato.

Otra etapa, si se quiere más científica, en el estudio del embrión de las aves fue jalonada por el físico alemán Albrecht Haller (1708-1777) cuyas notables observaciones acerca del pollo en particular aparecieron en su obra Elementa Physiologiae Corporis Humani.

Como acabamos de citar, durante diecinueve siglos, el quehacer embriológico recibió impulso gracias a esporádicas descripciones realizadas por un grupo reducido de inquietos grandes hombres cuyos hallazgos fueron más tarde rescatados en Specielle Physiologie des Embryo (W. Preyer, 1885) y The Development of the Chick (F.R. Lillie, 1908).

Con el comienzo del siglo XX, se incrementó el número de investigadores sobre el tema y ya entonces algunos de ellos prestaron atención específica a distintos fenómenos físicos y químicos asociados con el desarrollo embrionario.

Pero sin duda quien descolló en el análisis de la embriología comparativa enfatizando en el ave, fue J. Needham con la presentación de su libro Chemical Embriology en 1931.

Luego, la multiplicidad de investigadores que abordaron el tema y la cantidad de datos científicos obtenidos y disponibles hicieron del embrión de las aves un elemento de experimentación excepcionalmente útil por su versatilidad y otras razones.

EL EMBRION DE POLLO

La unión del material nuclear del espermatozoide y el óvulo, que tiene lugar en la parte alta del oviducto de la gallina aproximadamente 15' después de la ovulación, es del tipo poliespérmico en el que una sola cabeza espérmica alcanza el pronúcleo ovular mientras que las otras son rechazadas a las capas superficiales del vitelo y contribuyen a constituir el sincicio vitelino.

Luego de la fecundación, el óvulo es trasladado hacia abajo por los movimientos peristálicos del oviducto y al progresar a lo largo de la luz de este último, va siendo revestido: primero por sucesivas capas albuminoideas, más allá por membrana de envoltura y finalmente por una cubierta calcárea.

En el interior del oviducto ya se producen divisiones celulares del óvulo fecundado, que constituyen el primer cambio visible en el desarrollo del embrión desde el estado unicelular al multicelular, iniciándose así el período denominado segmentación o clivaje durante el cual se producen además desplazamientos de las masas celulares formadas.

Ambos procesos, divisiones o migraciones celulares, continúan algún tiempo sin que aparezcan órganos reconocibles.

Durante la segmentación se forman estructuras simples y sólo se insinua la diferenciación general posterior.

Recién y mucho más tarde, durante el período denominado de organogénesis, se determina la dirección definitiva de las divisiones celulares y la migración. Se puede decir entonces que existe ya una relación entre el cuerpo embrionario y las estructuras primitivas formadas durante las primeras horas de incubación.

Retomando la descripción del desarrollo embrionario en las primeras divisiones celulares, cabe recordar que éstas presentan ciertas características.

En primer lugar se trata de una segmentación parcial o mesoblástica y polar es decir que las divisiones celulares se producen sólo en un polo o extremo del huevo y por tal razón son más abundantes y completas en la zona central reproductora, e incompletas y escasas en la periferia y profundidad. Se forma así un primer esbozo embrionario achatado y redondeado llamado blastodisco o blastodermo que en principio cuenta, con dos células o blastómeros. Estas al reproducirse dan origen a cuatro, luego a ocho células y así sucesivamente.

Sintéticamente se puede afirmar que 15 minutos después de su formación, el blastodermo de dos blastómeros se multiplica al estadío de cuatro células y que una hora después aparece el estadío de ocho células. Estas a su vez demoran 45 minutos en transformarse en estadío de 16.

El blastodisco reposa sobre la masa vitelina , hasta el estadío de 32 células es macizo y constituye la mórula

(por su aspecto similar a una mora). (fig.n°1).

Las sucesivas divisiones celulares se aceleran entonces y se acompañan a partir de aquí, de otro fenómeno, que consiste en la estratificación o laminación central.

Las células centrales del blastodisco, al multiplicarse pero no unirse en el sentido céfalo-caudal del huevo, forman dos capas, una superficial y otra profunda, circunstancia que culmina con la aparición, debajo de la zona central del embrión, de una cavidad primitiva de segmentación denominada blastocele. Entonces la mórula pasa a denominarse blástula o más propiamente disco blástula, dado el aspecto achatado del gérmen. (fig.n°2).

El proceso de laminación comienza en un punto periférico del blastodisco que por ahora denominamos posterior.

Simultáneamente con la estratificación del embrión,el vitelo subterminal se licúa por fermentación, mientras el vitelo marginal, todavía sólido, soporta y se adhiere íntimamente a las células marginales del blastodisco, zona que se densifica.

Visto entonces exteriormente, el blastodisco presenta las zonas concéntricas; una central o traslúcida y otra periférica u opaca. (fig.n°3).

Finaliza aquí la etapa de segmentación del embrión que por otra parte, y desde el punto de vista cronológico, transcurre desde la fecundación hasta aproximadamente cinco horas

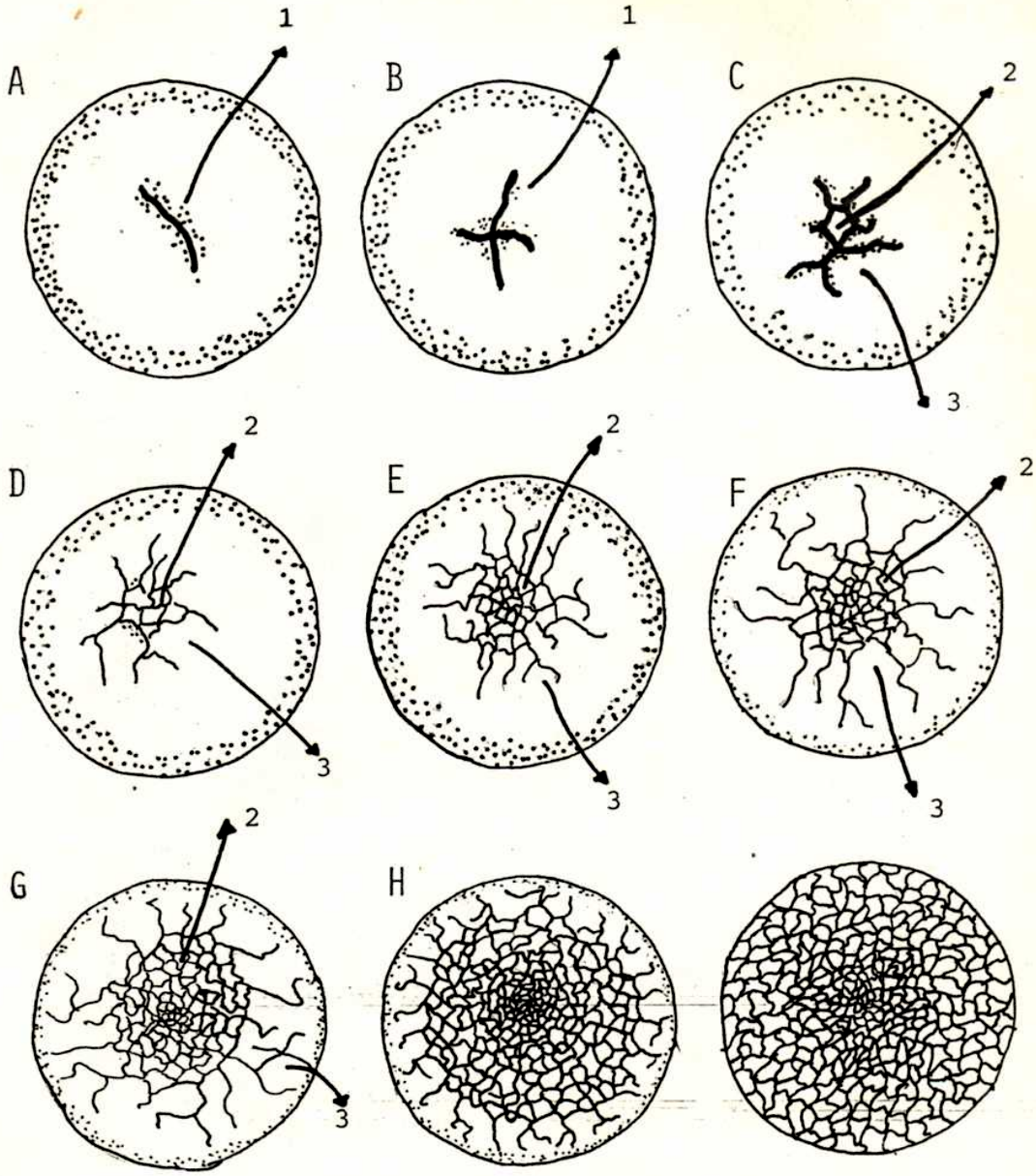

Figura n°1: VISTA EN SUPERFICIE DEL BLASTODERMO DEL POLLO DURANTE LA SEGMENTACION

Desde A hasta H muestra el aumento en el número de células visibles, desde que comienza la primera división celular hasta el estado de mórula.

1. zurco primario 2. células centrales 3.células marginales

4. mórula.("The Avian Embryo" Romanoff, A. pag 117).

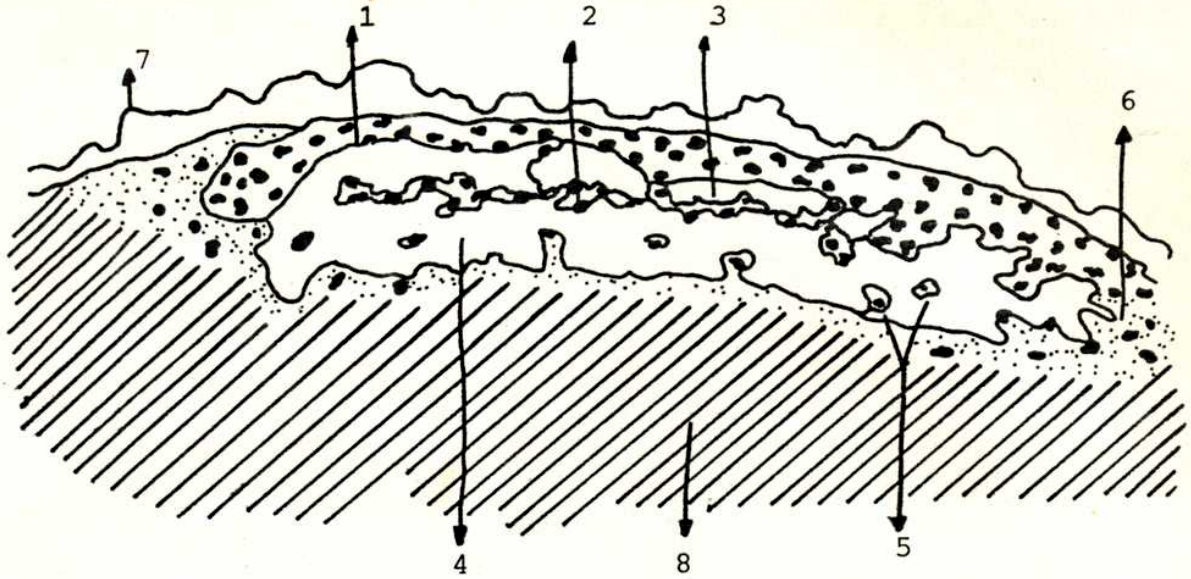

figura n°2: FORMACION DE LA BLASTULA EN LAS AVES

1. Ectodermo 2. Endodermo del vitelo 3.Blastocele 4.Cavidad complementaria 5. Células del vitelo 6. Sincicio marginal 7.Colema 8.Vitelo("Compendio de Anatomía Veterinaria" Embriología VI. Michel, G y otros pag. 51).

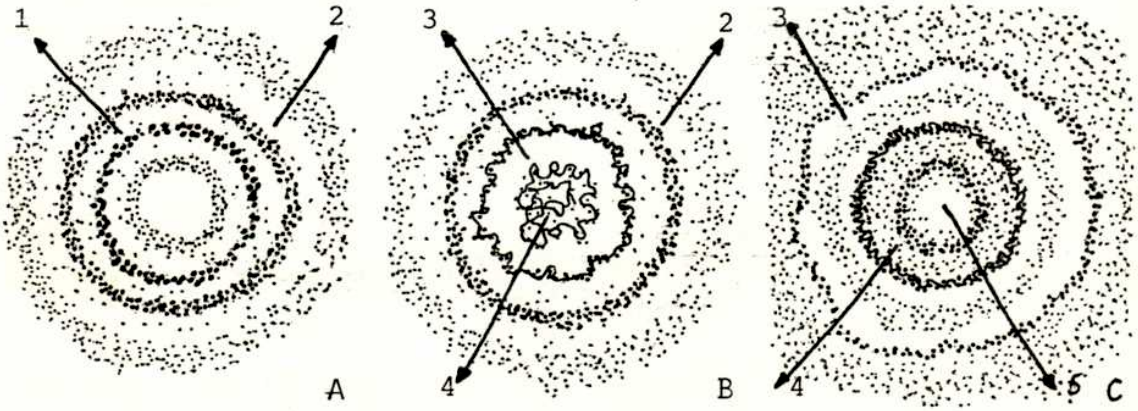

figura n°3: DIFERENCIACION DEL BLASTODERMO EN AREA PELUCIDA Y AREA OPACA

A: Apariencia del blastodermo 30 hs.después de la fecundación.
B: Blastodermo previo a la diferenciación en área pelúcida y área opaca.
C: Blastodermo aproximadamente 42 hs.después de la fecundación.
1.Blastodermo - 2.Periblasto - 3.Area opaca - 4.Area pelúcida
5.Núcleos de Panden vistos a través del área pelúcida.
("The Avian Embryo" Romanoff, A. pag 125).

de incubación, momento en el cual comienza el período de gastrulación.

Cabe anticipar que se han enunciado diversas teorías acerca del período que abarca la gastrulación de las aves y de las estructuras que participan en este proceso.

Enunciamos escuetamente las ideas más aceptadas.

La gastrulación en el embrión de pollo se inicia entre la 5° y 6° hora de incubación con un engrosamiento del blastodisco en la misma región posterior del área pelúcida que diera origen a estructuras ya vistas.

A partir de ese instante se forma progresivamente, hacia el interior de la zona pelúcida y a través de la cavidad de segmentación primitiva, una nueva capa celular que termina por dividir a aquella en dos: una superficial o cavidad de segmentación secundaria, y otra profunda o cavidad digestiva inicial o arqueteron.

A esta nueva capa se la denomina endodermo, y a la primitiva capa superficial de la zona pelúcida, ectodermo.(fig. n°4).

El mecanismo en sí de la formación del endodermo ha sido objeto de múltiples teorías, aunque la más aceptadas sean la de la invaginación y la de delaminación.

Por la primera, el endodermo se originaría a partir de la migración de afuera adentro y en sentido centrípeto de células superficiales del blastodisco, ubicadas en la perife-

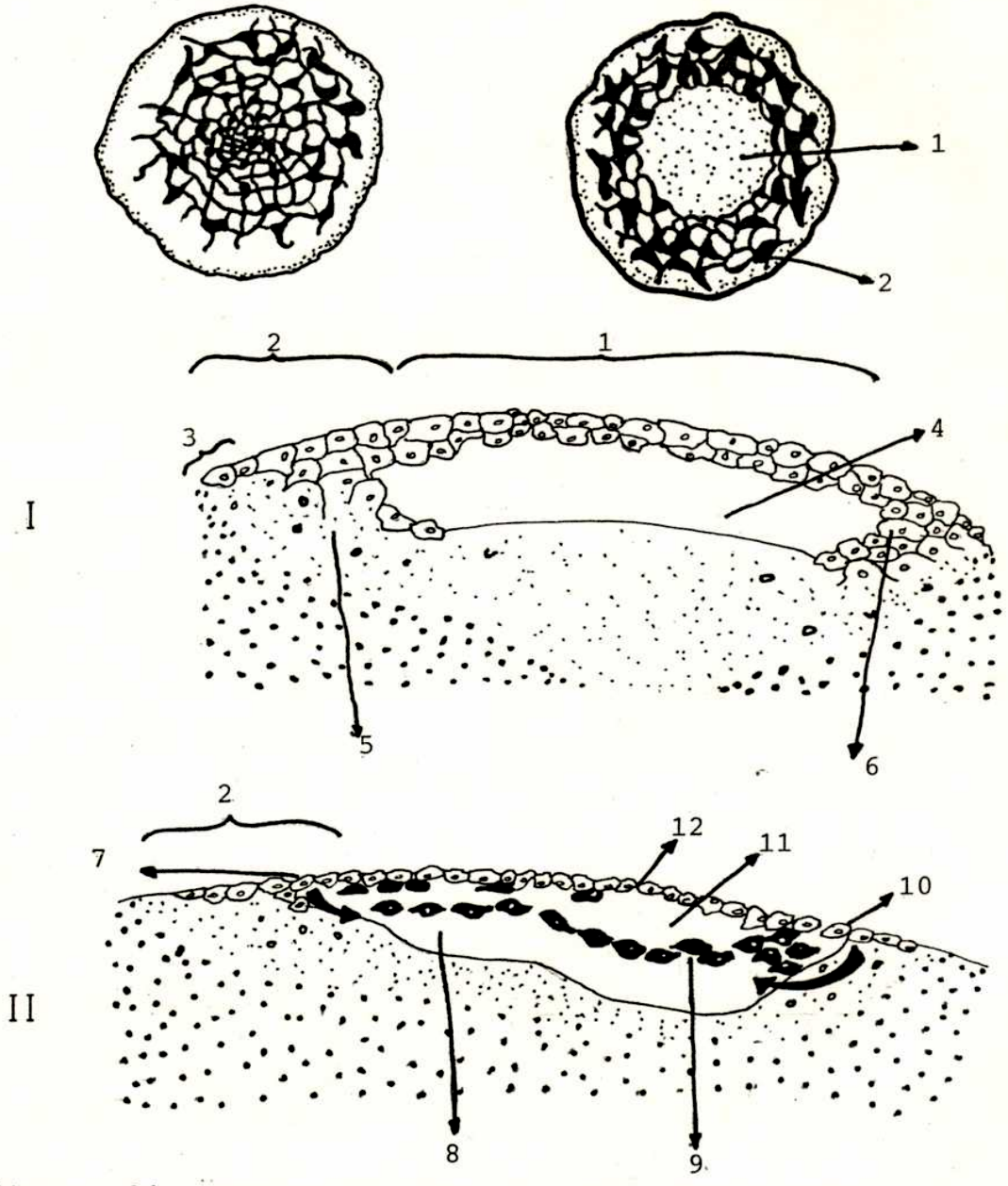

figura n°4: SEMENTACION FINAL DEL HUEVO EN LAS AVES

I-Sección de la blástula primaria, con el área opaca rodeando la zona pelúcida .

II-Sección de la blástula secundaria o blastodermo próximo a la puesta. Las flechas indican la formación del entófilo por enrollamiento sobre el contorno del área pelúcida.

1.Area pelúcida - 2.Area opaca-3.Zona de recubrimiento-4.Blastocele primario-5.Zona de unión-6.Capa germinativa-7.Región anterior del blastodermo-8.Arqueteron primario-9.Entófilo-10.Región posterior del blastodermo-11.Blastocele-12.Ectófilo- ("Embriología" Houllión, Ch. pag. 77).

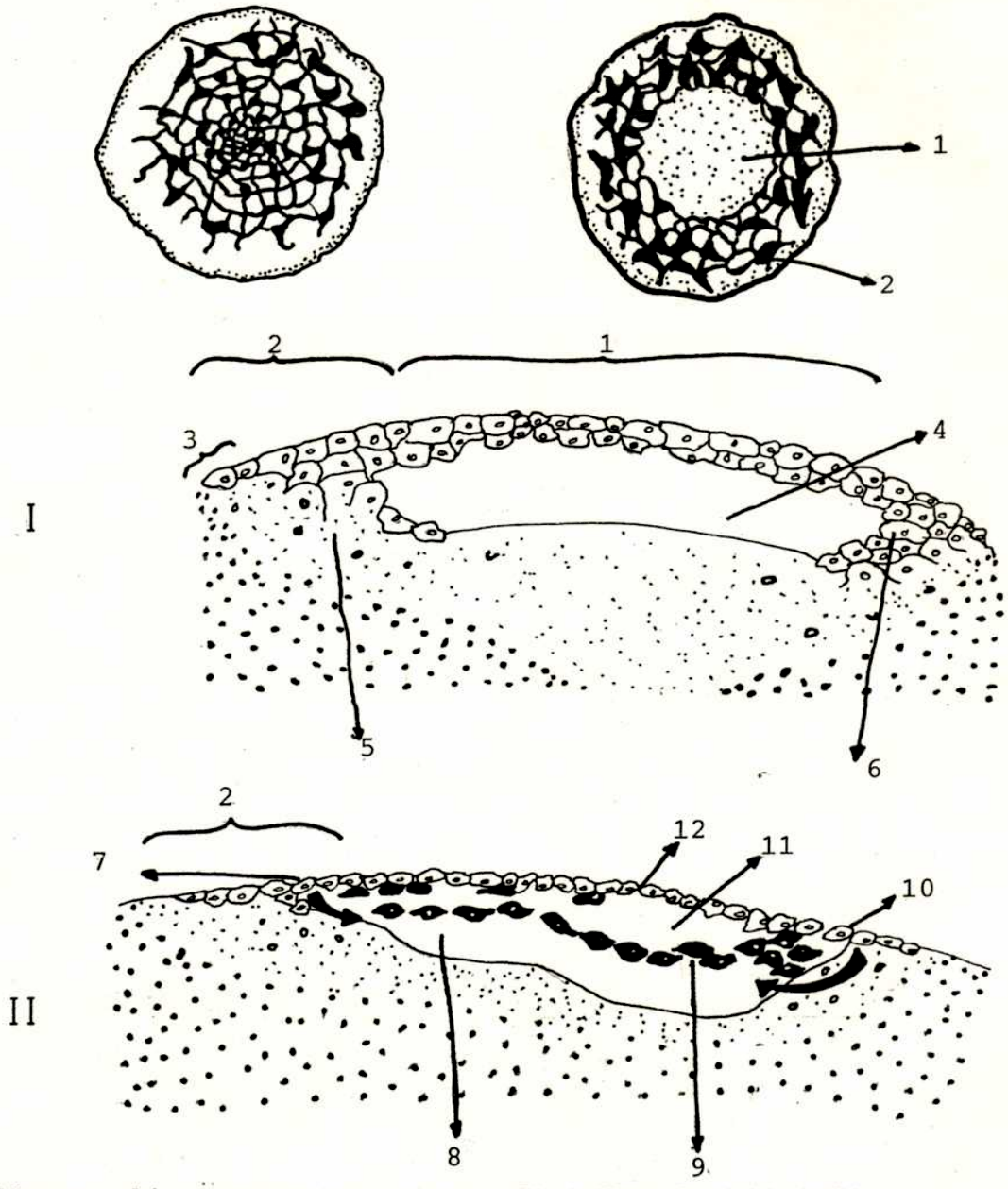

figura n°4: SEMENTACION FINAL DEL HUEVO EN LAS AVES

I-Sección de la blástula primaria, con el área opaca rodeando la zona pelúcida .

II-Sección de la blástula secundaria o blastodermo próximo a la puesta. Las flechas indican la formación del entófilo por enrollamiento sobre el contorno del área pelúcida.

1.Area pelúcida - 2.Area opaca-3.Zona de recubrimiento-4.Blastocele primario-5.Zona de unión-6.Capa germinativa-7.Región anterior del blastodermo-8.Arqueteron primario-9.Entófilo-10.Región posterior del blastodermo-11.Blastocele-12.Ectófilo- ("Embriología" Houllión, Ch. pag. 77).

ria de la zona pelúcida.

En cambio la delaminación acepta que el origen obedecería al desdoblamiento progresivo de la capa superficial y engrosada de la zona pelúcida.

Independientemente de la formación del endodermo,el engrosamiento caudal del blastodisco progresa hacia el polo superior hacia la 7° a 8° hora formando la línea primitiva, una estructura lineal a partir de la cual migrarán luego masas celulares hacia ambos lados que daría origen una vez llegado a su sitio definitivo, a una capa intermedia entre el ecto y endodermo, denominada, mesodermo.

La línea primitiva antes mencionada completa su formación a las 16 hs. de incubación con la aparición de un surco superficial, el surco primitivo, y con una compactación anterior, el nudo de Hensen.

La aparición de estos elementos coincide con el alargamiento considerable del blastodermo, especialmente en su región posterior.

La diferenciación o formación de las capas ecto, meso y endodérmicas caracteriza junto con las formaciones de la línea primitiva, el período de la gastrulación. Estos fenómenos consisten, según hemos visto, en una serie de procesos de multiplicación y migración celulares simultáneos y dinámicos, típicos de este período. (fig.n°5).

Entonces, aproximadamente a las veinte horas de incu

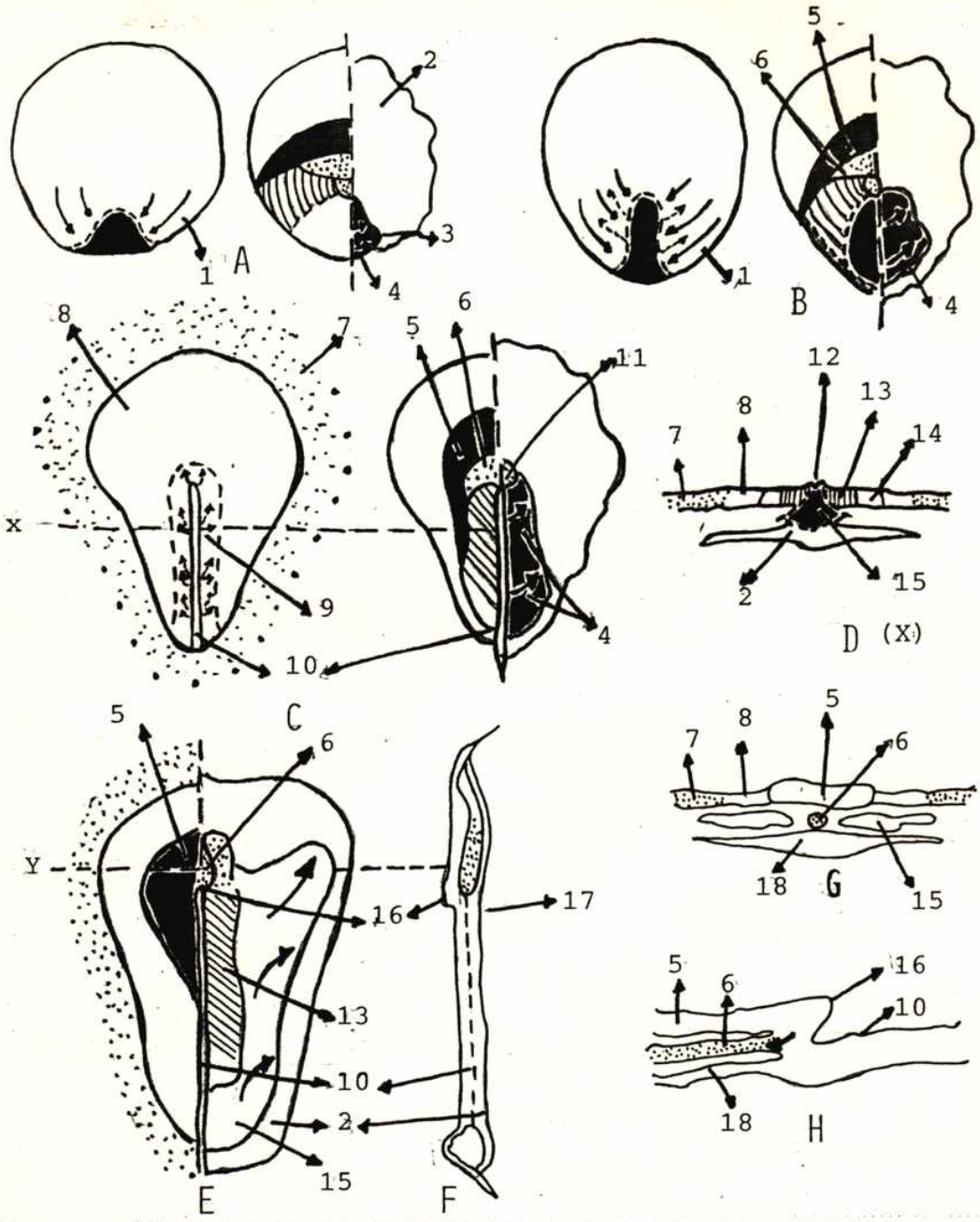

figura n°5: DESARROLLO EMBRIONARIO DURANTE LOS ESTADIOS DE 5 A 18 HORAS.

A: 5-6 hs. - B: 10 hs. - C: 16 hs. - D: 16 hs.corte transversal.
E: 18 hs. - F: 18 hs. - corte sagital. G: 18 hs. corte transversal.
H: Detalle del Nudo de Hensen.1.convergencia-2.entófilo-3.mesodermo lateral extraembrionario-4.divergencia-5.placa neural-6.corda-7.área opaca-8.área pelúcida-9.inmigración-10,línea primitiva-11mesodermo precordal-12. foseta primitiva-13.somitos-14.tejido nervioso-15.mesodermo-16.Nudo de Hensen-17.cavidad arquentérica primaria-18.endodermo-("Embriología"Houllión,Ch. pag.86).

bación el desarrollo del embrión entra en la etapa de organogénesis que se inicia por un nuevo engrosamiento o placa neural por delante de la prolongación cefálica y del nudo de Hensen. Al mismo tiempo entra en regresión la línea primitiva y aparecen los pliegues medulares y la notocorda, que formarán el eje esquelético origen de la columna vertebral.

A las veinticuatro horas la placa neural constituye el repliegue cefálico, especie de prominencia neta sobre el blastodermo que crece rápidamente. Al mismo tiempo se distingue, por transparencia en la zona pelúcida, una formación en dedo guante que es el esbozo del intestino anterior.

Simultáneamente son patentes cuatro pares de somitos.

Al principio los somitos son acúmulos celulares mesodérmicos que aparecen a los lados de la notocorda constituyendo segmentos del futuro tronco embrionario. Los somitos se completan al cabo del 5° día.

El ritmo en que se desarrollan es bastante constante. Es posible por consiguiente fijar la edad de un embrión considerando que se forma un par de somitos por hora después del estadío de veinte horas.

El primer par aparece a las 20 hs. de incubación, a las 50 hs. su número ha aumentado a 29 y a las 120 hs. se calculan ya 50 pares de somitos. En el embrión de pollo se cuentan 52 pares.

De los somitos se forma el esqueleto, parte de la

musculatura voluntaria y parte del tegumento.

Luego de las 24 hs., la línea primitiva prosigue con su regresión. Aparecen los pliegues medulares a partir de los cuales se originarán las regiones anteriores y posteriores del cerebro y comienza a verse el esbozo de la cabeza, del sistema nervioso y de los órganos sensoriales (oídos, ojos, nariz). (fig.n°6).

La circulación tanto embrional como extraembrional, se forma al final del primer día y al comienzo del segundo. A las 44 hs. el corazón empieza a latir, abasteciendo una vasta red de vasos.

En el estadío de 33 hs. se completa el cierre del cerebro anterior, el procencéfalo se hace prominente y se insinúan las vesículas ópticas y los primeros ganglios craneales. (fig.n°7).

La formación endodérmica progresa hacia atrás, hasta los somitos.

El mesodermo se divide en dos zonas, la primitiva o axial situada en la zona dorsal y la parietal o lateral de ubicación ventral. Ambas se hallan unidas por una franja estrecha denominada pedúnculo del segmento primitivo o lámina urogenital.

En el mesodermo de la zona axial, de mayor espesor, tienen lugar los desplazamientos celulares a partir de los cuales se forman los somitos, y a partir de esta zona se ha ori-

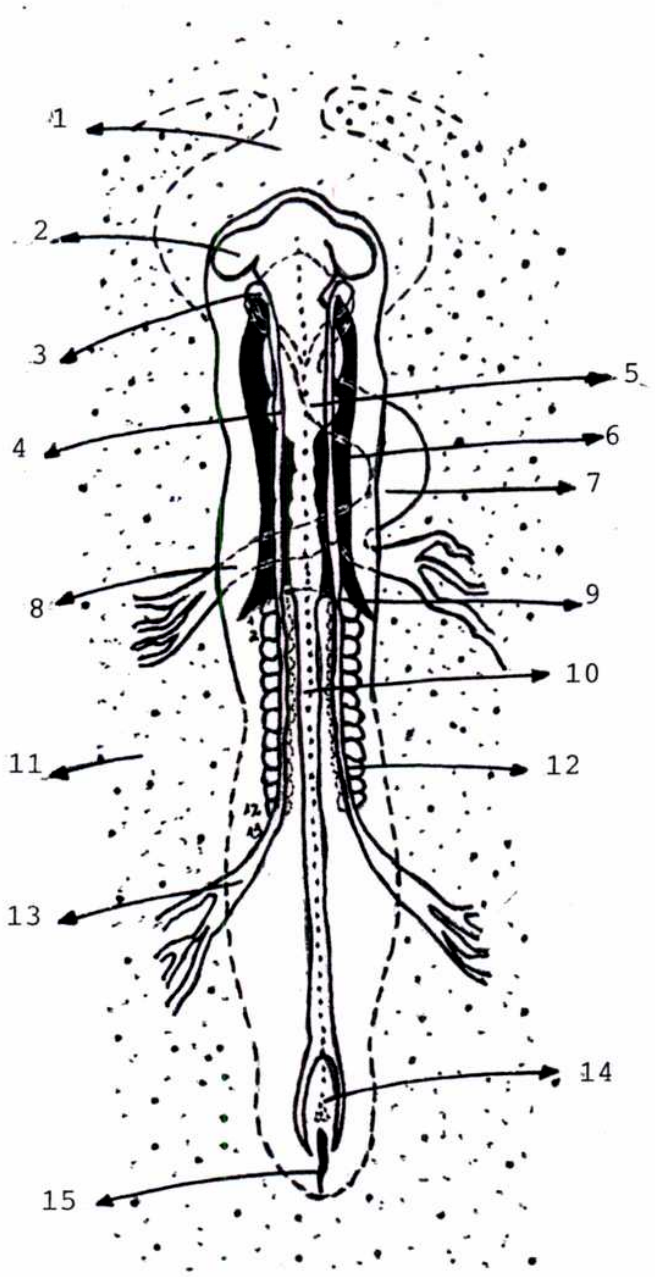

figura n°7: ESTADIO DE 33 HORAS -VISTA DEL CONJUNTO-
1.proamnios-2.procencéfalo-3.arco aórtico I-4.raíz aórtica dorsal-5.tronco arterial-6.intestino anterior-7.corazón-8.vena onfalomesentérica-9.límite posterior del tubo digestivo-10.tubo nervioso-11.área pelúcida-12.somito-13.arteria onfalomesentérica-14.seno romboidal-15.línea primitiva-
("Embriología", Houllión, Ch. pag. 88).

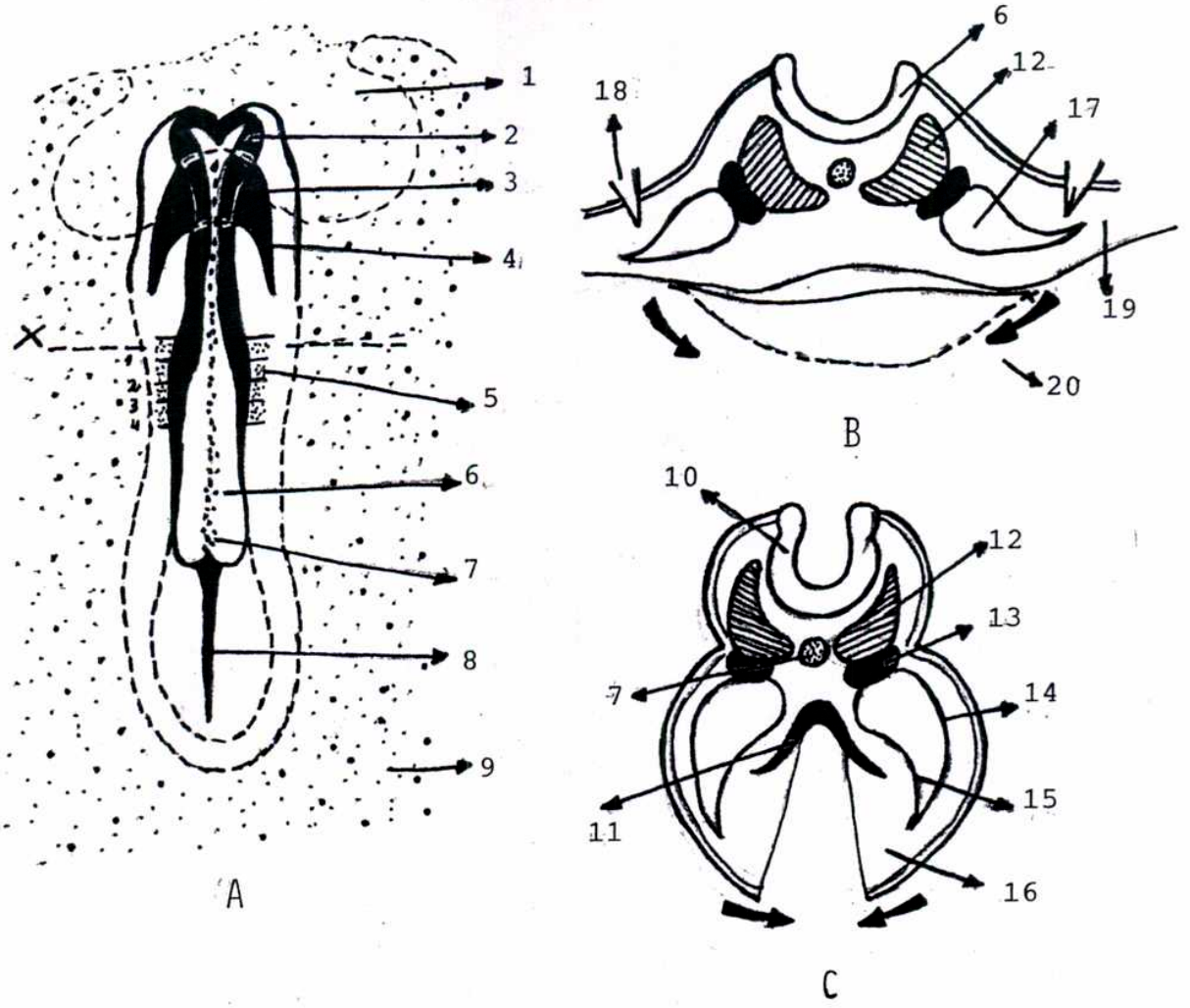

figura n°6: ESTADIO 24 HORAS

A: Visto del conjunto - B: Corte en el nivel X. - C:Blastodermo aislado y replegado.
1.proamnios-2.prosencéfalo-3.intestino anterior-4.límite posterior del tubo digestivo-5.región somítica-6.placa neural-7.corda-8.línea primitiva-9.área pelúcida-10.tubo nervioso-11.tubo digestivo-12.miótomo-13.pieza intermedia-14.somatopleura-15.esplacnopleura-16.vitelo-17.celoma de láminas laterales-18.recorte del blastodermo-19.arqueteron primario-20.yema.
("Embriología", Houllión, Ch. pag. 88).

ginado, como ya nombramos, el corazón y los vasos sanguíneos en forma de arcos aórticos.

El mesodermo lateral aparece separado en capas somato pleural y esplácnica en la región somítica. A partir de esta última capa la hoja fibrosa cutánea por un lado y por el otro la musculatura lisa y la base mesenquimatosa del saco vitelino.

Por este período también, el pedúnculo del segmento primitivo, originario de la lámina urogenital, se separa de las restantes capas del mesénquima y por diferenciación ulterior, derivan de ella el aparato urinario y genital. El desarrollo procede en tres estadíos, la primera estructura formada, el pronefros degenera rápidamente; la segunda, mesonefros, contribuye a la formación del sistema genital y la tercera, metanefros permanece en el riñón definitivo.

Hacia el final de este período las células del epitelio peritoneal del mesodermo comienzan a migrar para dar origen a la células corticales de la glándula suprarrenal. En cambio la médula se originará varios días después debido a la migración de las células cromafínicas del primordio del sistema nervioso simpático, de origen ectodérmico (13).

Con el rápido crecimiento del embrión, a las 36 hs., este empieza a girar lentamente sobre sí mismo para adoptar su orientación definitiva al cuarto día.

La enzima 3β-OH esteroide dehidrogenasa se ha pues-

to en evidencia por estudios histoquímicos en lo que los autores denominan "estadío 22" (correspondiente a 45 a 52 hs. del desarrollo), en células que no tienen aún un emplazamiento definitivo. (14).

Ya en el estadío de 48 hs. el blastodermo desarrolla las enzimas necesarias para convertir Testosterona a metabolitos 5β-reducidos (Actividad reductásica). Este hecho fue comprobado por Parson, I.C.en 1970 (15).

Los miembros se bosquejan entre el segundo y tercer día, al cuarto día se reconoce los inicios de las patas y de las alas y se separa la cabeza del cuerpo, con formación del cuello. Por ese entonces se inicia también el aparato respiratorio y los primeros sacos aéreos pueden verse en el sexto día como abultamiento de la pared de los pulmones.

Asímismo algunos autores sostienen que las gonadas, aún indiferenciadas comienzan a producir estrógenos (16).

En el quinto día puede decirse que el embrión está definitivamente esbozado en todos sus órganos (fig.n°8).En este día mucho otros tejidos ya poseen actividad funcional. Se demostró la presencia de corticoides en los esbozos adrenales, utilizando para ello el test biológico propuesto por Pedernera en 1971 (17). Así mismo se determinó inmunocitoquímicamente la presencia en adenohipófisis, de células productoras de LH (18). Esta presencia es previa a la diferenciación de la hipófisis que ocurre al sexto día del desarrollo (19).

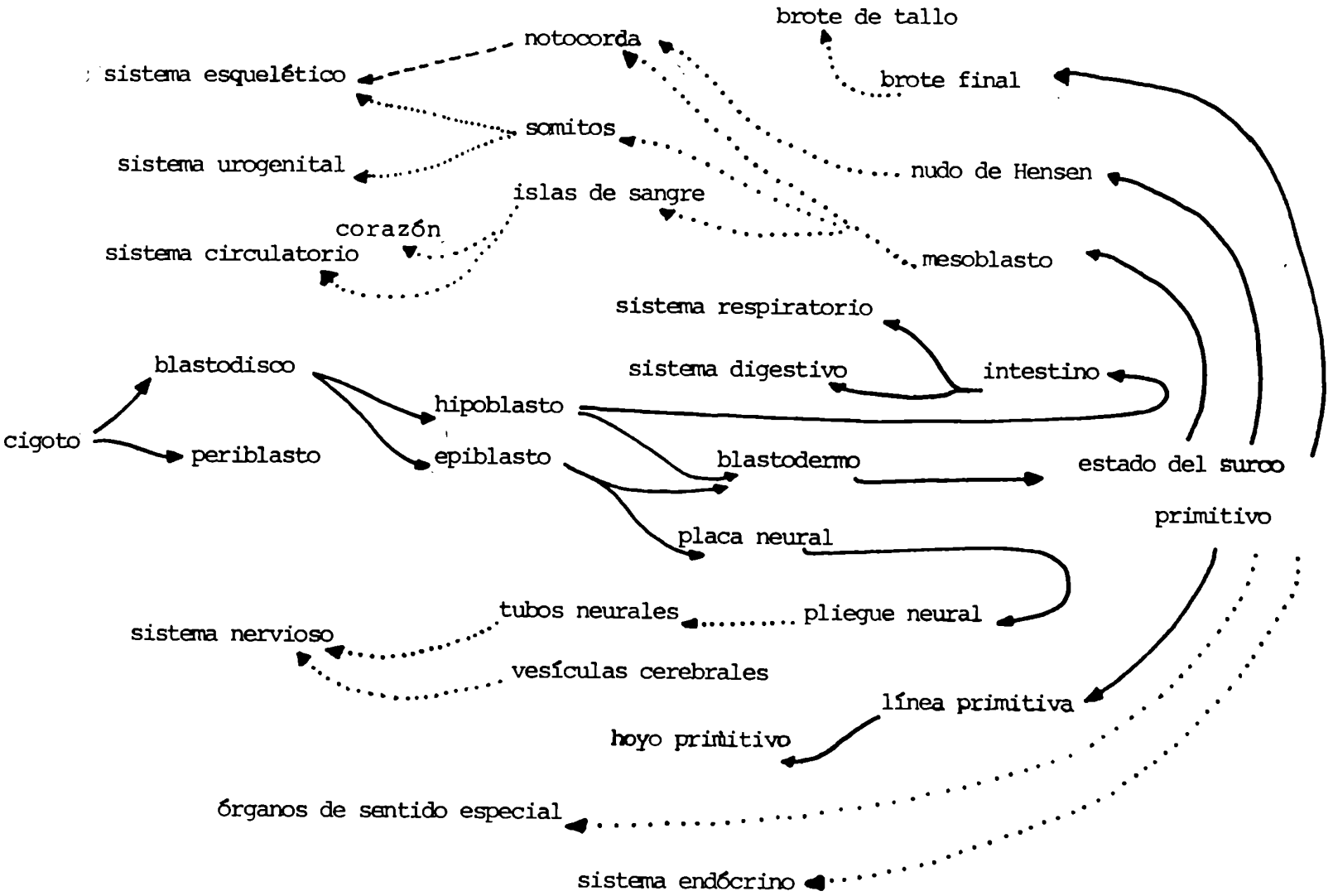

figura n°8: MORFOGENESIS TEMPRANA EN EL EMBRION DE POLLO

----- inducido —— conduce a estructuras transitorias ·····estructuras presumibles

("The Avian Embryo" Romanoff, A. pag. 114).

Al comienzo del quinto día se concreta la vascularización de las gonadas de ambos sexos y esto es evidenciado rápidamente, dado que al 5 1/2 día se detecta la presencia de andrógenos en sangre periférica (20). Al sexto día se encontraron 17-cetoesteroides en los anexos embrionarios. (21).

Las primeras plumas aparecen al octavo día de incubación y el emplume se completa en el tercer avo día.

La diferenciación sexual de las gonadas y de las adrenales ocurre entre el 6°-7° y 7°-8°respectivamente (22).En el 8° día se observa en los cordones medulares del ovario una importante síntesis de estrógenos (23).

En plasma de embrión de 7 1/2 y 9 1/2 días se detectó la presencia de estradiol y estrona respectivamente (24) y próximo al décimo día, ambas hormonas se detectaron en el líquido amniótico (25).

Pero el evento endócrino más importante ocurre en el estadío de 13 días: es en este momento en que los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-glándula endócrina se hallan maduros y se interrelacionan entre sí. Es lo que se ha dado en llamar interlocking endócrino. (18).

Todo este cronograma se puede aplicar a los ejes hipotálamo-hipófisis-ovario e hipotálamo-hipófisis-adrenal.

La maduración gradual del eje hipotálamo-hipófisis-gonada transcurre en tres períodos bien definidos (18).

El primero de ellos (el más temprano) de autonomía gonadal, durante el cual la síntesis y secreción de hormonas esteroides por las gonadas es independiente de la regulación hipotálamo-hipofisaria. (desde el día 5,5 al 12,5 del desarrollo aproximadamente).

Un segundo período (intermedio) o hipofisario gonadal rudimentario, en el que el desarrollo gonadal y la síntesis y secreción "aceptan" su dependencia de las gonadotrofinas hipofisarias (aparentemente un período muy corto coincidente con el día 13).

Y finalmente, el tercer período, a partir del día 13, en el que el eje hipotálamo-hipofisogonadal está maduro y en el cual se establecen ya la interacción entre los componentes hipotalámicos, adenohipofisarios y gonadales.

Una situación similar ocurre con las adrenales (25), por lo que estas consideraciones nos determinan de alguna manera, el estadío a partir del cual resulta operativo estudiar la regulación de esteroides en ovarios y adrenal por trofinas hipofisarias, es decir el día 13 del desarrollo embrionario.

Finalmente, para concluir con el desarrollo del embrión se observa que la calcificación del esqueleto comienza en el 10° día y termina hacia el día quince de incubación.

En el día 16 aparecen las formaciones córneas como el pico, etc. En este día se ha consumido toda la albúmina.

El día veinte disminuye el líquido amniótico, el pi

co aparece en la cámara de aire y comienza la respiración pulmonar. El allantoides se deseca entonces lentamente. En el día veintiuno el embrión gira sobre sí mismo y mediante el diente córneo ataca la cámara. Se produce lentamente el nacimiento.

Para completar abreviadamente este descripción del desarrollo del embrión de pollo expondremos en forma esquemática los tejidos y órganos que suministran las tres hojas germinativas durante la organogénesis.

El ectodermo proporciona: la epidermis y sus anexos; los epitelios orificiales, el sistema nervioso y parte de los órganos de los sentidos; la médula adrenal y los epitelios del corion y del amnios.

Del endodermo se forman los epitelios del tubo digestivo; de los aparatos respiratorio y urinario; del saco vitelino y el alantoides; los parénquimas de los anexos del tubo digestivo y de la tiroides, paratiroides y timo.

El mesodermo finalmente proporciona: los tejidos conectivos y de sostén de todos los aparatos y sistemas; el aparato circulatorio; la musculatura; el aparato urogenital, la corteza adrenal y la adenohipófisis.

No podemos finalizar los comentarios sobre el desarrollo del embrión de pollo sin dejar de mencionar dos aspectos trascendentes.

El primero se refiere a la cuestión nutricional. La albúmina es una sustancia esencial que no solo contribuye a la

formación de las estructuras sino que mantiene el medio que circunda el blastodermo en su pH óptimo (26), asimismo es de resaltar la importancia de los aminoácidos y las vitaminas para la promoción del crecimiento (27) y la glucosa, cuyo metabolismo es indispensable, sobre todo, en los estadíos iniciales(28) .

El segundo aspecto a señalar lo constituye la importancia de la influencia de los factores ambientales sobre el desarrollo durante las primeras etapas de la embriogénesis. Elementos tales como temperatura, vibraciones físicas, composición del aire ambiente, distintas radiaciones y finalmente condiciones experimentales especiales, son capaces de modificar profundamente el curso de la evolución embrionaria.

LA HIPOFISIS

La hipófisis es quizá, la más importante de las glándulas endócrinas en el pollo adulto, ya que, además de secretar sustancias consideradas esenciales por sí para la homeostasis, actúa mediante las hormonas, como coordinadora o reguladora de otros elementos endócrinos.

En el embrión, además su rol está ligado, entre otros, a un aspecto embriológico determinante como es la diferenciación sexual.

En el animal adulto se visualiza como una evaginación redondeada que pende del diecencéfalo por el tallo hipo-

fisario y está alojada en la silla turca, una concavidad del hueso esfenoides, situada debajo del quiasma en la base del cráneo. (29).

Pesa aproximadamente nueve gramos y el cuerpo glandular está dividido, en el pollo, en dos partes: anterior o adenohipófisis y posterior o neurohipófisis, que reconocen distinto origen y funciones. (30).

La adenohipófisis, a su vez presenta dos lóbulos(31) uno ventral más grande o pars distalis y otro dorsal más pequeño o pars tuberalis.

La neurohipófisis posee como principal estructura, el lóbulo neural que se ubica dorsalmente a la porción caudal de la pars distalis.

Toda la hipófisis está encapsulada por la duramadre y la irrigación se debe a ramas de la carótida interna para el lóbulo anterior y a las arterias hipofisarias para el posterior. La sangre de las pars distalis es drenada directamente al seno cavernoso (31).

Las principales fibras nerviosas que pasan del cerebro a lapituitaria son los fascículos hipotálamico - hipofisarios que transcurren por el tallo hipofisario (29).

Los nervios de este tracto llegan a la región dorsal del quiasma óptico, núcleos situados en la pared del tercer ventrículo(30).

Las fibras nerviosas mencionadas llegan hasta las

pars tuberalis y aparentemente no inervan las pars distalis. (32).

Desde el punto de vista embriológico, la adenohipófisis es una estructura mesodérmica que se origina a partir de la bolsa de Rathke; evaginación esta última del epitelio oral que tempranamente se dirige desde la cavidad bucal hacia el diencéfalo.

En tanto, la neurohipófisis esboza a partir del diencéfalo, reconoce una estirpe ectodérmica y se encuentra bien formada a partir del séptimo día de incubación.

La primera evidencia del desarrollo hipofisario la constituye una evaginación ectodérmica en el techo de la cavidad oral que aparece después de 43-46 hs. de incubación y dará origen a la bolsa de Rathke (33).

Esta evaginación consiste en una capa de células situadas bajo el tejido mesodérmico anterior respecto de la notocorda y en íntimo contacto con la base del cerebro.

Una vez formada, la bolsa de Rathke -o hipofisaria, se expande lateralmente hacia arriba. A las noventa y seis horas de incubación se distingue ya el esbozo del pars tuberalis (19); mientras que en el sexto día se diferencia totalmente la región caudal de la pars distalis.

En el embrión de siete días, la hipófisis posee dos formaciones anguladas a 90°, una de ellas es paralela a la base del cerebro. La otra es paralela a un tallo epitelial que

conecta con el techo de la boca.

A ir desapareciendo el tallo, la porción hipofisaria que le era paralela se aleja de la faringe y busca su ubicación difinitiva, también en la base del cerebro (34).

La contribución cerebral para la formación de la pars nerviosa comienza con el desarrollo del proceso infundibular en el embrión de siete días.

En el embrión de catorce días el proceso infundibular es más glandular y su tallo, previamente del todo epitelial, está rodeado de fibras nerviosas (35).

En el embrión de trece días aparece rodeando la pars distalis, una hoja de tejido conectivo que se transforma en una densa cápsula periglandular en los dieciseis días de incubación.

Respecto de la citología, en un primer momento las células de la hipófisis son epiteliales no especializadas y luego de la diferenciación se observan tres tipos celulares mayoritarios; las acidófilas, basófilas y cromófobas, éstos últimos, a su vez, precursores de los anteriores.

Es difícil determinar el período exacto de aparición de todas estas células, dado que esto depende en gran medida, de la técnica histológica utilizada.

Las células basófilas generalmente aparecen antes que las acidófilas. Es así como Wilson en 1948 (36) determinó la presencia de células basófilas en el lóbulo anterior de la

pituitaria ya en el sexto día de incubación, mientras que Moscona y Moscona (37), años más tarde, encontraron unas pocas células cromfílicas de ambos tipos en el primer día.

Por otra parte otros autores (38), recién observaron una marcada basofilia, en el octavo día y en ambos lóbulos.

De todo lo anterior se deduce que la embriogénesis citológica transcurriría así: las primeras células basófilas que aparecen al sexto día tienen gránulos negros y son inmaduras. Hacia el octavo día, las grandes y redondeadas células basófilas aparecen en el lóbulo cefálico y en la tercera semana de incubación, las basófilas del lóbulo caudal comienzan su diferenciación final.

Simultáneamente con esto último algunas de esas células caudales basófilas inmaduras adquieren cierta acidófila hacia el día dieciocho y se transforman en acidófilas caudales (39).

Durante este período la pituitaria embriónica se colma de células acidófilas muy coloreadas que rápidamente se restringen al lóbulo caudal.

En el animal adulto, con ambos tipos celulares bien diferenciados, a su vez, se pueden distinguir entre las basófilas dos subtipos, a saber: a) las células que contienen glucoproteínas, cuyas propiedades citoquímicas permiten agruparlas dentro de las Pas+ (ácido peryódico de Shiff) (40).Entre ellos se encuentran, las células β (cefálicas), δ (cefálicas y caudal) y γ (caudales).

b) las células κ (cefálicas o de ambos lóbulos), cuyo núcleo se tiñe de hematoxilina y que pertenecen a un tipo celular mixto y no reaccionan con el PAS.

Entre las células acidófilas, se distinguen dos subtipos como: a) las células proteináceas, del tipo α (caudales) y η (cefálicas) y b) las células ε (cefálicos) de tipo mixto.

Todos los grupos celulares arriba citados, poseen características tintoriales y propiedades citoquímicas bien definidas y fácilmente diferenciables (41).

Los métodos histológicos han permitido así demostrar la presencia de diversos tipos celulares en la hipófisis de las aves y por otro lado, los procedimientos bioquímicos han permitido establecer que la glándula segrega un número de hormonas que estaría correlacionado con cada tipo celular.

A continuación reseñaremos brevemente las hormonas, su actividad y la correlación mencionada.

Fraps y col. en 1947 (42), sugirieron la existencia de una LH y una FSH en hipófisis de pollo, pero sólo fue comprobada veinte años después por Stockell Hartree y Cunnigham (43) quienes aislaron dos fracciones hormonales, utilizando técnicas de bioensayo con standards de mamífero.

No se han podido desarrollar aún, ensayos específicos para identificarlos. Hasta la actualidad sólo contamos con:

1) Bioensayo en mamíferos: es una técnica bastante aceptable y se basa en el método de la depleción del ácido

ascórbico en ovario de rata (OAAD) (44), y el aumento del peso del ovario de rata (45).

2) Bioensayos en aves: depende de la habilidad de las gonadotrofinas para estimular el crecimiento testicular en pollo joven (46) y finalmente;

3) Inmunoensayo: que utiliza antisuero de otra especie (ensayo heterólogo). Este ensayo no es específico dado que se producen reacciones cruzadas (47). Utilizando antisuero y hormona purificada de pollo (ensayo homólogo) (48) la técnica aumenta significativamente su especificidad.

Se desconoce en aves, la función exacta de ambas gonadotrofinas puras. Sin embargo cuando FSH de mamífero es inyectado en pollos produce el crecimiento de los túbulos seminiferos, favorece la división meiótica de los espermatocitos primarios, que conduce a los secundarios y posiblemente favorece también la división de la espermatogonia. Asímismo la LH de mamífero estimula la producción de andrógenos en células de Leydig (49, 50).

En aves hembra, las gonadotrofinas de mamíferos estimulan el crecimiento folicular, la esteroidogénesis y la funcionalidad del oviducto, pero no está bien determinada la acción de una u otra hormona en estos mecanismos (49, 50, 51). Al igual que en mamíferos, la LH induce la ovulación en aves. (52).

Las hormonas gonadotróficas glicoproteicas parecen estar relacionadas con las células PAS+ del tipo β y las del tipo γ (53).

La TSH de pollo fue parcialmente purificada (54), y se encontró que es en cuanto a actividad y química, similar a la TSHm, es decir una glicoproteína de alto PM que se identifica con las células δ (o las azul alcian +), cuya actividad es mayor en el lóbulo cefálico.

La TSHa mantiene el trofismo de la tiroides, estimula la producción de tiroxina, y regula el metabolismo de I_2 en esta glándula.

Otra hormona adenohipofisaria del pollo es la PRL, sustancia proteica de PM 32.000.

El efecto de PRL está asociado a una serie de eventos que directa o indirectamente están relacionados con la reproducción, y muchas veces requiere de la presencia de otras sustancias endócrinas para producir una respuesta completa. De esa forma la PRL de ave junto a hormonas esteroides provocan la hiperplasia de la placa de empolladura, evento que induce en el ave el instinto de empollar los huevos (55).

Las células que probablemente intervienen en la producción de PRL, son la acidófilas η.

El ACTH de ave al igual que el de mamífero, es lábil al calor y al pH (56). Es un péptido de alto PM, cuyo punto isoeléctrico se halla a pH 4,7.

Es capaz de estimular la producción de Corticoides por la suprarrenal. Se relacionaría con las células ε de la adenohipófisis.

La melanotrofina (MSH) es probablemente la primera hormona en aparecer durante el desarrollo embrionario del pollo, aproximadamente al 5° día de incubación.

Su actividad aumenta durante el segundo período y permanece constante después del nacimiento. Parece intervenir en el control de la pigmentación del plumaje (57), y se relacionaría con las células hipofisarias del tipo κ.

Se ha observado que el extracto de pituitaria de pollo posee actividad de hormona de crecimiento (GHa), dado que al ser inyectado en ratas inmaduras hipofisectomizadas provoca el ensanchamiento de la epífisis de la tibia, el aumento del peso corporal y la retención de N_2 (58). Esta actividad es ocho veces menor que la de un extracto de pituitaria de rata, lo que reflejaría el bajo nivel de GH en el pollo, o diferencias de estructura y/o actividad entre especies. Inmunológicamente antiGH bovina no tiene reacción cruzada con el extracto de pituitaria de pollo (59). Posiblemente esta hormona sea secretada por las células α.

EL OVARIO

El sistema genital de los pollos comprende, órganos

primarios o gónadas en las que se desarrollan las células germinales y órganos accesorios que conducen las células germinales fuera del cuerpo.

Las gónadas femeninas poseen un ovario funcional izquierdo y un ovario derecho rudimentario.

Respecto del izquierdo, se trata de un órgano redondeado, poligonal, dividido en lóbulos, arracimado y de consistencia friable.

Yace debajo y delante del riñón fijado en su posición por un ligamento y tejido conectivo. Está relacionado por delante, con los pulmones, el diafragma, el hígado y el intestino; por arriba, con los pulmones y por detrás con el oviducto y el intestino.

Su tamaño, que depende del estado funcional, varía en la gallina adulta, entre el de una avellana y el de un huevo.

La irrigación está a cargo de la arteria ovárica, rama de la renolumbar o de la aorta (29), y la sangre es drenada por grandes venas que se anastomosan y convergen formando la vena anterior y la posterior que desembocan en la cava (60).

Desde el punto de vista del estudio del parénquima, cabe señalar en primer lugar que el ovario del pollo sigue el modelo de los vertebrados. Y es así que al corte se distingue en su interior una zona cortical o corteza, externa, y otra zona medular o interna.

En la zona cortical preponderan las células germina-

les e intersticiales en tanto que en la medular se observa el estroma, compuesto por tejido conectivo y células intersticiales especiales.

Volviendo a la zona cortical, es de destacar que en su periferia se encuentra el epitelio germinal integrado por folículos, cada uno de los cuales contiene una célula ovular (ovocito u ovogonia).

Una cantidad limitada de estas células, cuyo número es millonario, madura durante el transcurso de la vida animal y da origen a los óvulos maduros, que fecundados o no son eliminados periódicamente al exterior en forma de huevos.

Pero la gran mayoría de las células ovulares y con ellas también los folículos que la contienen, conservan un tamaño microscópico. De ellas sucumbe la mayor parte (atresia folicular), cuando todavía apenas ha sido posible percibir su existencia (61).

Un corte sagital del folículo permite distinguir los estratos siguientes de adentro a afuera.

Interiormente se halla el lóbulo, seguido de un epitelio germinativo, que asienta sobre la túnica albugínea en cuyo estroma conectivo hay dispersas células intersticiales especiales.

A continuación se detecta otra capa de tejido conectivo en forma de cápsula o teca que en el folículo maduro se divide a su vez en teca interna y externa. El conjunto se ha-

lla envuelto en un tejido muy vascularizado. Los folículos maduros se encuentran en las capas más profundas de la zona cortical (29).

En el ovario aparecen también folículos regresivos, de dos clases. La primera corresponde a aquellos que han cedido su célula ovular, cuyo vacio resultante se cierra y cicatriza con depósito de pigmento luteínico procedente de la teca interna y proliferación de células luteínicas, formándose así el cuerpo atrésico con actividad endócrina y que involuciona a corto plazo (62).

La segunda categoría de folículos regresivos, se refiere a los que sufren degeneración preovulatoria, en distintos estadíos de maduración y su primera indicación histoquímica es la aparición de una zona lipídica rodenado el ovocito como una masa sudanófila, colesterol positivo.

El conjunto pierde su integridad al desintegrarse el folículo y se disgrega en grupos entre el estroma.

Para concluir con la breve descripción de la zona cortical, remarcaremos que el ovario muestra durante todo el año una uniformidad histológica con gran número de folículos en distintos estadíos del desarrollo, así como un espectro de cuerpos atrésicos en distintas etapas de evolución y cuyo origen es el que hemos señalado anteriormente.

Respecto de la zona medular que ocupa la parte interna del órgano y se suele denominar también bulbo del ovario,es

tá integrada por un estroma de tejido conectivo, gran cantidad de vasos y nervios, células intersticiales y cordones celulares producto de la invaginación del epitelio germinal.

Las células intersticiales ováricas han sido estudiadas por Marshall y Coombs (63) quienes distinguen dos tipos:las células intersticiales glandulares exfoliculares y las células intersticiales del estroma, desarrolladas estas últimas a partir de las células del tejido conectivo de la zona medular.

El desarrollo embrionario del ovario propiamente dicho o diferenciación sexual tiene primera señal el engrosamiento del epitelio germinal del esbozo indiferente que ocurre durante el séptimo día de incubación.

Esto ocurre generalmente después que en el testículo.

La separación neta entre el epitelio de la glándula germinal y el núcleo mesenquimatoso, desaparece durante el desarrollo, porque las células germinales se disponen formando cordones que se dirigen desde la periferia hasta el centro.

El núcleo mesenquimatoso aumenta el tamaño como consecuencia del desplazamiento constante de células a partir del epitelio. Los cordones celulares dan origen a acúmulos celulares esféricos que contienen casi siempre una o varias células sexuales primitivas u óvulos primitivos.

Al formarse los acúmulos celulares de referencia se va distinguiendo en el ovario una zona cortical y otra medular.

Los acúmulos corticales se transforman ulteriormente

en folículos.

La túnica albugínea se forma más tarde en la zona cortical.

Las células intersticiales que aparecen según algunos autores después del nacimiento provienen de la médula, según Brode (64), de células del tejido conectivo del estroma, y de las glándulas exfoliculares de las células de la teca interna de los folículos vesiculares atrésicos.

Si bien más adelante y durante el tratamiento específico del tema motivo de este trabajo, nos ocuparemos minuciosamente de la función bioquímica de las hormonas del ovario, haremos aquí un breve adelanto.

Ya en la década del 60, estudios cromatográficos demostraron que el ovario, tanto del embrión (65, 66) como del pollo adulto (67, 68, 69, 70), es capaz de producir hormonas. También fueron reconocidos estrógenos, progestágenos y andrógenos en el plasma de pollo doméstico (71, 72).

Por otra parte, las células intersticiales ováricas poseen la ultraestructura característica del tejido esteroidogénico y reaccionan positivamente a los ensayos para la 3β -OH esteroide Dehidrogenasa (3β-OHEDH), colesterol y sudanofilia.

A pesar de estos conocimientos, el sitio intraovárico de la síntesis hormonal en el pollo es aún especulativo.

Los mismos conceptos enunciados para las células intersticiales son válidos en lo que respecta a actividad, para

el tejido granuloso y tecal del folículo preovulatorio, el post ovulatorio y el atrésico a distintos estadíos, lo que fue comprobado por distintos autores (73), 74, 75, 76, 77).

Más aún, todos estos tejidos a la microscopía electrónica poseen una fina estructura, compatible con actividad esteroidogénica.

La diferenciación sexual del embrión comienza entre el 5° y 6° día del desarrollo.

El primordio gonadal izquierdo constituido en ese momento por corteza y médula, posee una organización bisexual; en cambio el derecho constituído por una médula rodeada de sólo algunas porciones aisladas de corteza, posee una organización unisexual (androgénica).

En vista, de los conocimientos actuales sobre el papel de las hormonas esteroides sexuales en la diferenciación, y teniendo en cuenta la relación dosis-respuesta, podemos afirmar que la cantidad de hormonas correspondientes a cada sexo se halla determinada genéticamente (78).

En consecuencia, en el desarrollo normal, aquel componente hormonal gonadal producido en mayor cantidad determina la dirección de la diferenciación sexual. Esta hormona gonadal es conocida entonces con el nombre de diferenciador.

La hormona sexual femenina es el diferenciador o condicionador de los caracteres sexuales en el embrión de pollo.

La gonada, ya sexualmente diferenciada, produce en

estadíos posteriores del desarrollo embrionario, mayor cantidad de hormonas sexuales específicas y su concentración circulante es entonces suficiente para regular el curso de la diferenciación de las estructuras sexuales.

La confirmación de la síntesis y liberación de hormonas sexuales en estadíos tempranos de la diferenciación gonadal plantea al investigador un amplio espectro de interrogantes entre los que destaco dos de relevancia.

El primero consiste en establecer, en qué medida la síntesis y secreción de hormonas esteroides sexuales depende, durante cada estadío, de la estimulación por gonadotrofinas hipofisarias.

Y el segundo interrogante, relacionado con el primero, sería en qué momento comienza la síntesis de esa gonadotrofinas en la pituitaria anterior y cuándo se segregan a sangre circulante.

Para responder a estas preguntas sólo existen controvertidas evidencias de que los procesos involucrados en la diferenciación sexual durante los estadíos tempranos serían independientes de la acción hipofisaria (79, 80), y que a medida que se diferencian las gonadas, estas aumentan su capacidad de respuesta frente al estímulo gonadotrófico adenohipofisario (81, 82).

Y para finalizar comentaré brevemente las teorías más destacadas que explican el origen de la asimetría ovárica

en esta especie.

Dantchakoff en 1932 (83) propuso que la capacidad de las gonadas para formar su corteza depende de la proporción relativa de las células germinales depositadas en el primordio gonadal. Además considerando las ideas de Swift (1915) (84) respecto del origen de las células germinales en la cavidad preoral y su posterior vuelco a sangre venosa, Dantchakoff encontró una explicación mecánica para esa distribución particular.

Es así que en los estadíos de 22-25 somitos (43-55hs. de incubación), las venas arteriales que se hallan detrás de la arteria mesentérica, se convierten en filtros que retienen, las células germinales circulantes. Y una asimetría en este sistema arterial, que se produce durante la rotación del embrión hacia el lado izquierdo, sería entonces la responsable de las cantidades desiguales en ambos lados.

En cambio Witschi en 1935 (85) desarrolla su teoría de la siguiente forma;

Al comienzo del 3° día de incubación las células germinales primordiales se distribuyen simétricamente en las anchas placas esplácnicas derecha e izquierda.

En el curso del 3° día las células germinales izquierda y derecha migran y se unen para ser colectadas al final del día en un espacio abierto entre los cordones mesonéfricos.

Luego de esta agregación, se produce una nueva separación de las células germinales en fibras apareadas, 5 ó 6 so

mitos más largas, entre las cuales la izquierda más fuerte, contiene de 3 a 10 veces más células germinales que la derecha.

Durante el 4° día comienza la organización de las gonadas indiferentes.

Mientras que estas se forman, las células germinales del primordio invaden tanto la corteza como la médula.

Tanto la médula derecha como la izquierda contienen en este momento igual número de oogonias, por lo tanto la asimetría es debida principalmente al menor número de células germinales en la corteza derecha.

El autor concluye que la asimetría de las glándulas sexuales de las aves se debe a una deficiencia primaria y hereditaria del inductor cortical derecho, deficiencia esta que se expresa en sí misma en la menor atracción ejercida sobre las células germinales primordiales, especialmente durante la fase de su redistribución en las primeras horas del 3° día.

LA SUPRARRENAL

Las glándulas suprarrenales o sencillamente suprarrenales son órganos pares, oval el izquierdo, con aspecto de gorro frigio el derecho, de color amarillo anaranjado, que se ubican por delante y dentro de los riñones y debajo de la bifurcación de la vena cava posterior, dentro de la cavidad abdominal (vena cava caudalis) (29).

La glándula izquierda está irrigada por una arteria propia y la derecha recibe la sangre proveniente de la arteria renal correspondiente.

La sangre venosa, deriva por venas especiales que desembocan en la cava posterior.

Ambas glándulas están envueltas por una cápsula conectiva delgada rica en nervios y vasos.

Un corte sagital del órgano muestra que está formado por dos zonas, cortical y medular que difieren por su origen y función.

Pero ambas formaciones no se encuentran tan claramente definidas como en los mamíferos, sino penetrados uno a otro y envueltos el uno por el otro, tan íntimamente fusionados que en su punto de contacto se hallan más o menos mezclados sus elementos constitutivos.

Este, es exactamente el tercer estadío de penetración recípocra del desarrollo ontogenético y constituye un claro ejemplo del mismo (86).

De todas maneras la sustancia medular predomina en el curso del desarrollo embrionario, pero la mayor parte de la glándula está constituída más tarde por la corteza. Las hembras poseen un 30% más de tejido cortical que los machos, en relación con el peso corporal.

El desarrollo de las suprarrenales comienza con la aparición de la sustancia cortical, el cuarto día de incubación.

Las primeras células constituyen un engrosamiento del epitelio peritoneal próximo al mesonefros y a la aorta abdominal.

Esta sustancia cortical en el embrión de 4 1/2 días, forma grupos sólidos a cada lado del mesentereo (87) y a los cinco días de incubación migran ya a su posición definitiva entre los mesonefros y la aorta.

Al 6° día de incubación se observan grandes masas celulares ovaladas que se unen entre sí, y sus células tienen núcleos netos y abundantes figuras mitóticas. Una fina capa de tejido conectivo separa estas células corticales del mesonefros.

Al séptimo día, el tejido conectivo antes mencionado comienza a formar la cápsula, alguna de cuyas fibras penetran en la glándula y van tabicando el tejido cortical que adopta entonces una disposición cordonal.

Y al octavo día la masa de tejido cortical tiene el doble de tamaño que la sección de la aorta a ese nivel y su vascularización se incrementa durante las 24 hs. siguientes.

La embriogénesis de la porción medular es distinta de la cortical y reconocería un origen ectodérmico a partir del sistema nervioso simpático.

Sus células por su afinidad tintorial especial por el cromo se denominan cromafínicas o cromafines, y aparecen en el embrión de cinco días y siete horas de incubación, como células grandes ovales que migran ventralmente desde los troncos simpáticos a cada lado de la aorta pasando entre esta última,

y los grupos de células corticales.

A los siete días de incubación, una buena cantidad de células cromafines ha penetrado el tejido adrenal.

A los nueve días las células simpáticas de la periferia de la glándula desaparecen y las intraglandulares adoptan una posición acordonada o encolumnada alrededor de los vasos.

Las mitosis son raras y la distribución de los cordones uniformes.

El desarrollo después del noveno día de incubación, depende del crecimiento de los tejidos cortical y cromafin.

Los espacios vasculares son mayores en el centro de la glándula y semejan capilares cerca de la periferia y ambos tejidos nobles se encuentran en contacto con una profusión vascular.

El tejido conectivo de la cápsula se hace más denso cada vez hasta el día 17.

En el momento del nacimiento, la disposición interna es similar a la del animal adulto, es decir, las sustancias cortical y medular están mezcladas y donde generalmente los cordones medulares están dispersos en su retículo de cordones corticales.

El aspecto histológico de la zona cortical muestra una homogeneidad de la población celular cuyos elementos presentan vacuolas lipídicas en la zona basal citoplasmática,mien

tras que en la zona apical del núcleo se acumulan los cuerpos densos y estructuras especializadas.

Estas células se distribuyen de manera diferente según la profundidad y permiten diferenciar una delgada capa subcapsular y una gruesa central (88).

En contraste con las células corticales, las medulares o cromafines no tienen un ordenamiento tan definido y hasta llegan a estar entremezcladas con el tejido interrenal.

Estas células medulares responden a dos tipos que difieren según el tamaño y densidad de sus gránulos (89); uno de ellos agrupa células que contienen gránulos alargados de tamaño muy irregular (500-800Å), mientras que el otro tipo posee gránulos esféricos, regulares y más pequeños que los otros.La mayor parte de la médula esta constituída por células del primer tipo (90).

Los gránulos se ubican próximos al aparato de Golgi y se supone que la membrana granular se origina en este último, y al contactar con la membrana celular elimina su contenido al espacio intersticial a través de una abertura en la zona de contacto.

Dado que oportunamente durante el tratamiento específico del tema nos detendremos en la función y química de las hormonas adrenales, sólo haremos ahora una breve reseña de la cuestión.

La corteza suprarrenal interviene en la síntesis de

una serie de sustancias esteroides denominadas corticoides. Como en el caso de los mamíferos, entre ellos se destacan la corticosterona (B), aldosterona (Aldo) y 18OH-corticosterona(18OH-B) como la más abundantes y que cumplen un importante papel metabólico (91, 92).

Entre las funciones de estas hormonas reguladoras cabe señalar: el efecto hiperglucemiante de B y cortisol (F); el aumento de la acumulación de glucógeno en hígado y, relacionados con estos procesos, el balance nitrogenado negativo por estimulación del catabolismo proteico (93), la hiperlipidemia; la reducción de las proteinas de la cáscara del huevo; el aumento de la retención del Sodio; la regulación de la excreción electrolítica extrarrenal (94) y la atrofia testicular.

A manera de un sólo ejemplo experimental de estas acciones comentaremos que la zona subcapsular es particularmente reactiva a alteraciones del balance de sales (95). Así se encontró que especies consumidores de agua salina poseen células corticales superficiales menos activas que aquellas habituadas al consumo de agua común (96).

Las células medulares secretan catecolaminas, principalmente nor-epinefrina (97), siendo responsables de esta última las células con gránulos irregulares, mientras que las células de gránulos regulares intervendrían en la formación de otra catecolamina, como lo es la epinefrina (98).

CAPITULO II

SINTESIS, SECRECION Y REGULACION DE HORMONAS ESTEROIDES DEL EJE OVARICO EN EL EMBRION DE POLLO DE HEMBRA

La secreción esteroidea no se diferencia en Gallus de la generalidad de estas secreciones a través del phylum vertebrados, ni en su naturaleza, ni en su origen, función o regulación.

Como en todos los vertebrados, los progestágenos en un sentido amplio (ya sea Progesterona, 17OH-Progesterona o 11OH Progestrona), son intermediarios de andrógenos, estrógenos y corticoides, siendo su síntesis regulada por la adenohipófisis a través de sus hormonas proteícas y peptídicas (99).

Del mismo modo se han confirmado los mecanismos de acción hormonal que, a semejanza de lo que ocurre en mamíferos se inician en la membrana plasmática de las células efectoras, continúan con la endocitosis de las trofinas, luego, con la intervención del AMP cíclico como segundo mensajero y al final con la respuesta específica del tejido efector.

Pero a diferencia de especies mamíferas, en cuyo ovario se pudo detectar la presencia de sitios receptores para las gonadotrofinas utilizando hormonas marcadas con radioiodo, esta búsqueda ha sido infructuosa en aves (100).

Por consiguiente en este capítulo me ocuparé prime-

ro de los antecedentes bibliográficos acerca de la sintésis y secreción de hormonas esteroides y su regulación por trofinas hipofisarias en el ovario de pollo en algunos estadíos aislados. Luego describiré mis experimentos tendientes a aclarar sistemáticamente, estadío a estadío, la esteroidogénesis ovárica en el embrión de esta especie, durante el desarrollo, y la regulación de la misma, completando así lo publicado anteriormente.

ANTECEDENTES SOBRE SINTESIS, SECRECION Y REGULACION EN EL POLLO A PARTIR DE LA ECLOSION

En el pollo fuera del huevo se evidenció la producción de progesterona (Pg) y estradiol -17β (E_2) como productos principales, a partir de precursores radiactivos como el acetato -^{14}C, Octanato de Sodio -^{14}C y colesterol -^{14}C (101, 77, 102).

Se observó asimismo en este modelo, una coincidencia entre la proporción de esteroides producidos y la alta actividad de la enzimas Δ5, 3βOH-Esteroide Dehidrogenasa (3βOHEDH) y 17βOH-Esteroide Dehidrogenasa en células de granulosa ovárica.

Los componentes foliculares responsables de la síntesis de esteroides, demostraron ser para la progesterona, las células de la granulosa y para testosterona (T) y E_2 las células tecales ováricas (103).

En plasma se hallaron todos los componentes citados en los párrafos anteriores y además 20α y βOH-progesterona.

El estudio de las hormonas hipofisarias LH y FSH se ha limitado a su determinación en plasma e hipófisis de pollos sexualmente maduros y en particular en el período próximo a la ovulación (104, 105, 106, 107, 108). La influencia de estas trofinas sobre la síntesis y secreción de hormonas esteroides se puso de manifiesto a través del aumento inducido por LH de mamífero (LHm) y LH de pavo (LHp), en aquel modelo, de la síntesis de progesterona ovárica.

La inducción por hormona ovina fue 10 veces más potente que la provocada por LHp. La diferencia observada podría deberse a propiedades intrínsecas de la LHp o de su receptor y no a la pureza de la preparación (109, 110).

Esta respuesta también se comparó con la que producían las fracciones purificadas de gonadotrofinas de aves(111) Se observó que ambas LH eran equipotentes, pero que la FSH de pollo (FSHch), menos potente que su LH homóloga, era sin embargo más efectiva que la FSH ovina (109, 110).

El efecto de LHm sobre progesterona es paralelo al que sigue la tiofilina sobre el AMPc, tal como se evidencia por el aumento de los niveles del AMPc (probable mediador de la inducción de la esteroidogénesis por gonadotrofinas) (18, 112, 113).

ANTECEDENTES SOBRE SINTESIS, SECRECION Y REGULACION EN EL EMBRION DE POLLO

En este modelo, se han utilizado distintas técnicas para la determinación de la esteroidogénesis gonadal.

Así, utilizando precursores radiactivos Guichard y col (114) demostraron que tanto la Pregneholona-^{3}H como la Progesterona-^{14}C son transformados a esteroides sexuales por los ovarios embrionarios, siendo la Pg el mejor precursor de esteroides totales.

No observaron diferencias significativas entre ambos sexos, ni entre los distintos estadíos del desarrollo.

En embrión de 15 días se logró sintetizar 17OH-Pg, 20α y 20β-Pg y androstenodiona (115).

La producción endógena de los esteroides ováricos se estudió mediante técnicas de radioinmunoensayo (116).

Con experimentos con cultivo de tejido, resultó que el medio de cultivo contenía principalmente E_2, T y DHA; mientras que el tejido gonadal contenía Pg y E_1.

La producción total de esteroides se incrementó al aproximarse el nacimiento y se han encontrado diferencias cuali-cuantitativas en la producción de esteroides de ambos ovarios. El ovario derecho por sus características rudimentarias posee una menor capacidad esteroidogénica.

La producción de Pg (pg/par gonadas) tiene un máxi-

mo entre los días 12-13 del desarrollo. Si se expresa esta producción como porcentaje del total de esteroides producidos, se observa que es mayor la gonada derecha que la izquierda.

La síntesis de DHA se incrementa marcadamente en cuanto progresa el desarrollo.

Los ovarios poseen una gran capacidad para sintetizar ambos estrógenos, siendo más importante la producción de E_1. El E_2 presenta un perfil variable con dos máximos en los estadíos 10 y 15. La síntesis de estrógenos en el ovario derecho es menor que en el izquierdo.

En aves, se comprobó que el ovario embriónico es mucho más activo que los testículos (41, 101).

Estas hormonas sintetizadas, son rápidamente secretadas por las gonadas en desarrollo y su presencia fue detectada en distintos fluidos biológicos.

Así Ozon en 1969 (117) determinó la concentración de E_1 y E_2 en fluido amniótico de embrión de 10 días y en el allantoideo del de 13 días, utilizando técnicas de fluorímetría.

La concentración plasmática, durante el desarrollo embrionario, de T y E_2 fue determinada por radioinmunoanálisis (24, 40).

El perfil de E_2 muestra un aspecto bifásico con su inflexión en el estadío de 12,5 días. Este modelo coincide con el del crecimiento y diferenciación bifásicos del conducto de Müller izquierdo en el embrión de pollo hembra.

La concentración endógena de LH plasmática se determinó en los estadíos de 17 y 20 días del desarrollo(101).

Finalmente, los estudios de inducción de la esteroidogénesis por gonadotrofinas de el embrión tampoco fueron muy extensos.

Es así que, estudios in vitro demostraron que las gonadotrofinas están involucradas en la diferenciación funcional y morfológica de las gonadas embrionarias (118, 119)y que estas trofinas estimulan espontáneamente la esteroidogénesis, en ovarios de embrión de 18 días de incubación (118).

En este caso el agregado de LH al medio de incubación aumenta la producción de Pg. radiactiva obtenida a partir de Glucosa ^{14}C, pero no a partir de otros precursores radiactivos como el acetato, octanato, ácido mevalónico, lactona y colesterol (120).

Además, el agregado de amninoglutetimida inhibe la estimulación de LH. Esto implicaría que a pesar de la aparente baja biosíntesis que se obtiene con sustratos-^{14}C exógenos, las células de la granulosa utilizan el complejo enzimático del clivaje de la cadena del colesterol para sintetizar Pg.

Se comprobó también la estimulación con LH en ovario izquierdo y derecho, en embriones de 12 y 15 días pero utilizando dos sistemas distintos: un cultivo de células luego de una digestión con colagenasa y separación de las mismas con metrizamida a fin de identificar las productoras de hormonas es

teroides (121) y un cultivo directo de células (122).

En ovario izquierdo la estimulación de LH incrementó cuatro veces la producción de E_2 y la de FSH aumenta la producción de este estrógeno al doble.

En ovario derecho estos incrementos equivalen a 3.7 y 3.2 veces respectivamente, siendo necesario en este caso utilizar una concentración de FSH cinco veces mayor que la de LH.

La digestión no provoca pérdida de actividad y la fracción que más responde a la influencia de gonadotrofinas es la de las células epiteliales.

La estimulación del ovario derecho por LH produce predominantemente T (122, 20).

Por otra parte, no se obtuvo respuesta de ninguno de los ovarios a la acción de ACTH (123).

Aprovecho esta descripción del aspecto hormonal en el embrión de pollo para comentar los hechos experimentales que evidencian con particular claridad el estadío en el que comienza el interlocking endócrino previamente citado en el Capítulo I.

En el ovario izquierdo el perfil de 17β-E_2, demostrable inmunocitoquímicamente presenta un aspecto bifásico, manteniéndose a niveles aproximadamente constantes desde el día 6,5 hasta el 12,5 del desarrollo. Pero luego comienza un marcado aumento desde el estadío 13.5 al 18.5 (16). Este mismo

perfil bifásico se observó en el E_2 plasmático (24).

Estos resultados reciben después una explicación con base experimental. En efecto, estudios in vitro demostraron, que los ovarios de embrión de 8 a 18 días del desarrollo (122) así como los ovarios y testículos del embrión de 18 días (118, 124) comienzan a responder al agregado exógeno de hCG en el medio de cultivo.

El conjunto de estos resultados indicaría que el aumento de la síntesis y secreción de E_2 ovárico hacia el día 13.5 del desarrollo, es decir en el comienzo de la segunda mitad del período de incubación, refleja la iniciación del regulación gonadotrófica en la esteroidogénesis ovárica (125).

Woods y col. (18) demostraron la presencia de células productoras de LH en adenohipófisis de ambos sexos a partir del día 5,5 del desarrollo y el marcado aumento de estas células a partir del día 12,5 lo que se transforma en una nueva evidencia de la influencia de LH en el 2° período de incubación.

Por otra parte, en embriones decapitados se puso de manifiesto la naturaleza autónoma del desarrollo gonadal previa al día 13.5 con los siguientes parámetros: tanto el peso (18), como la cantidad de tejido intertubular (79), el contenido de colesterol (126), los parámetros vasculares (18), la actividad de la $\Delta 5,3\beta$HSD (125), la síntesis de andrógenos (127) y los niveles plasmáticos de Testosterona (128), no varían des

perfil bifásico se observó en el E_2 plasmático (24).

Estos resultados reciben después una explicación con base experimental. En efecto, estudios in vitro demostraron, que los ovarios de embrión de 8 a 18 días del desarrollo(122) así como los ovarios y testículos del embrión de 18 días (118, 124) comienzan a responder al agregado exógeno de hCG en el medio de cultivo.

El conjunto de estos resultados indicaría que el aumento de la síntesis y secreción de E_2 ovárico hacia el día 13.5 del desarrollo, es decir en el comienzo de la segunda mitad del período de incubación, refleja la iniciación del regulación gonadotrófica en la esteroidogénesis ovárica (125).

Woods y col. (18) demostraron la presencia de células productoras de LH en adenohipófisis de ambos sexos a partir del día 5,5 del desarrollo y el marcado aumento de estas células a partir del día 12,5 lo que se transforma en una nueva evidencia de la influencia de LH en el 2° período de incubación.

Por otra parte, en embriones decapitados se puso de manifiesto la naturaleza autónoma del desarrollo gonadal previa al día 13.5 con los siguientes parámetros: tanto el peso (18), como la cantidad de tejido intertubular (79), el contenido de colesterol (126), los parámetros vasculares (18), la actividad de la $\Delta 5,3\beta$HSD (125), la síntesis de andrógenos(127) y los niveles plasmáticos de Testosterona (128), no varían des

de el momento de ser decapitados (33-36 hs.) hasta el día 13.5, luego de este estadío se observan modificaciones.

De resulta de lo expuesto, se evidencia la necesidad de completar o determinar ciertos parámetros del eje propuesto en la introducción general.

Entre estos cabría mencionar la valoración de las hormonas liberadoras de gonadotrofinas en hipotálamo y su influencia sobre la hipófisis en los distintos estadíos embrionarios.

Y siguiendo un orden descendente en el eje hipófiso-gonadal, también se observó ausencia de datos en lo que respecta a concentración de LH y FSH en tejido de hipófisis. En lo que hace a LH sérica esta se determinó en sólo dos estadíos del desarrollo utilizándose para ello un inmunoensayo heterólogo. Así mismo no hay valores demostrados de FSH séricos. Se hace necesario entonces realizar estas determinaciones con ensayos homólogos a fin de comprobar la síntesis de gonadotrofinas por la hipófisis y su liberación a sangre periférica.

Igualmente, tanto los valores de Pg en tejido ovárico, como los de Pg y E_2 sérica, en la bibliografía consultada, no fueron objeto más que de determinaciones aisladas, y por ello, se hace necesario, no sólo repetirlos sino completarlos sistemáticamente a través del desarrollo con el objeto de adquirir conocimientos seriados de la síntesis de Pg en la glándula y la liberación real de estos esteroides a circulación general.

Para ratificar o rectificar la idea acerca de la influencia de las gonadotrofinas hipofisarias en la síntesis y secreción de los esteroides gonadales arriba mencionados, es procedente la estimulación gonadal por esas trofinas, sistemáticamente en todos los estadíos estudiados, y la determinación del número de receptores y la Ka de unión en ambos ovarios, con el objeto de investigar un posible paralelismo entre los mecanismos gonadotróficos reguladores gonadales en aves y mamíferos, éstos últimos muy estudiados.

Los comentarios elaborados en los párrafos anteriores explicitan los múltiples interrogantes y las necesidades más llamativas que se plantean al considerar los mecanismos reguladores del eje propuesto. Por distintas razones, sólo nos ocuparemos de una parte de estos mecanismos.

A continuación expongo mis trabajos al respecto.

PUNTO I

CONTENIDOS HIPOFISARIOS DE LH Y FSH

Parte de las tareas desarrolladas en este punto I fueron realizadas por el Dr. Follet, Brian K., en la Universidad de Bristol, Bristol, Inglaterra.

1. MATERIAL Y METODOS

1.1. Extracción y Preparación de Muestras

Para estos ensayos se han utilizado 200 embriones de pollo hembra doble pechuga, genética Copp, en los estadíos de 13, 15, 17, y 19 días y pollos recién nacidos.

Tanto las determinaciones de LH como de FSH se realizaron en un extracto de hipófisis.

Los animales se sacrificaron por decapitación, resecando luego la calota y dejando expuesto el encéfalo y sus envolturas. (figur.n°9).

Se disecaron cuidadosamente los hemisferios cerebrales, el cerebelo, el quiasma óptico y la glándula pineal, arribando de esta forma a la silla turca, dentro de la cual se encuentra la hipófisis. (fig. n°10).

La hipófisis se ubica inmediatamente detrás del quias

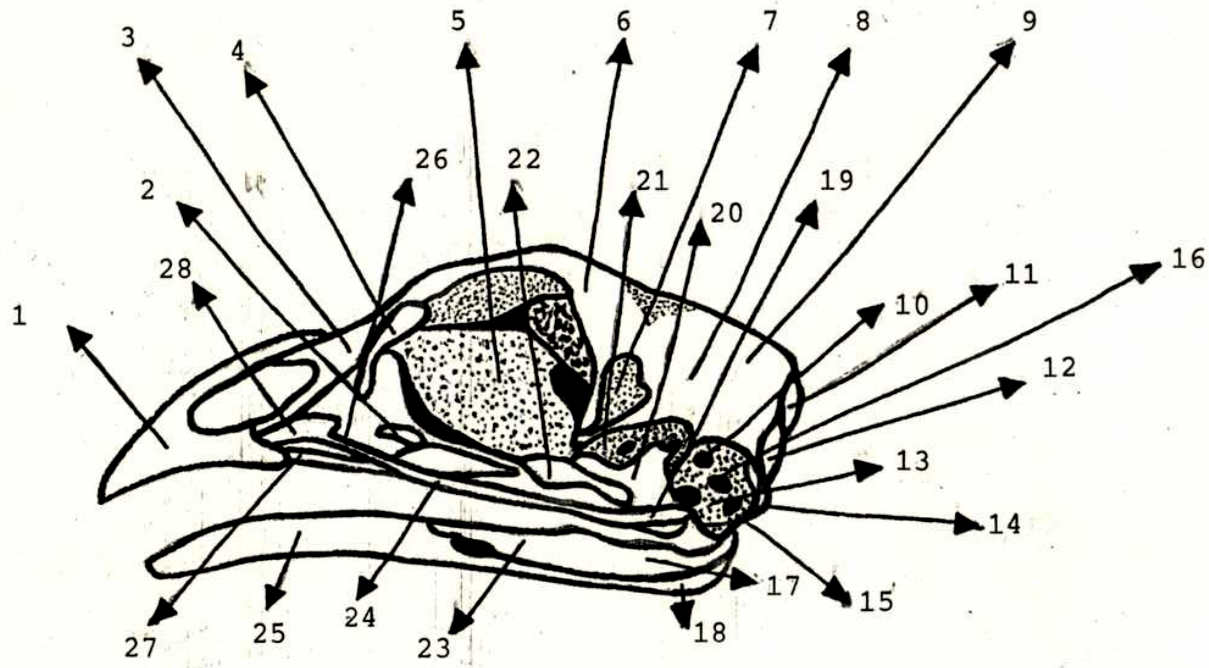

Figura n°9: VISTA LATERAL DE LA CALAVERA DE POLLO

1. Premaxila - 2.Vómer - 3.Nasal - 4.Pre frontal - 5.Septo Interorbitario - 6. Frontal - 7. Fosa temporal - 8.Escamoso -9.Parietal - 10.Agujero Neumático - 11. Supra occipital - 12.Exoccipital - 13.Cavidad timpánica - 14.Cóndilo del Basiocci pital - 15.Abertura de la región posterior de la calavera - 16.Trompa de Eustaquio - 17.Articular - 18.Angular - 19.Cuadrado jugal - 20.Cuadrado - 21.Pleuro es fenoides - 22.Terigoideo - 23.Supraangular - 24.Jugal - 25.Dentario - 26.Maxilar- 27.Palatino - 28.Apófisis Palatina.
("Anatomía de las Aves" EDE, D.A. pag. 105).

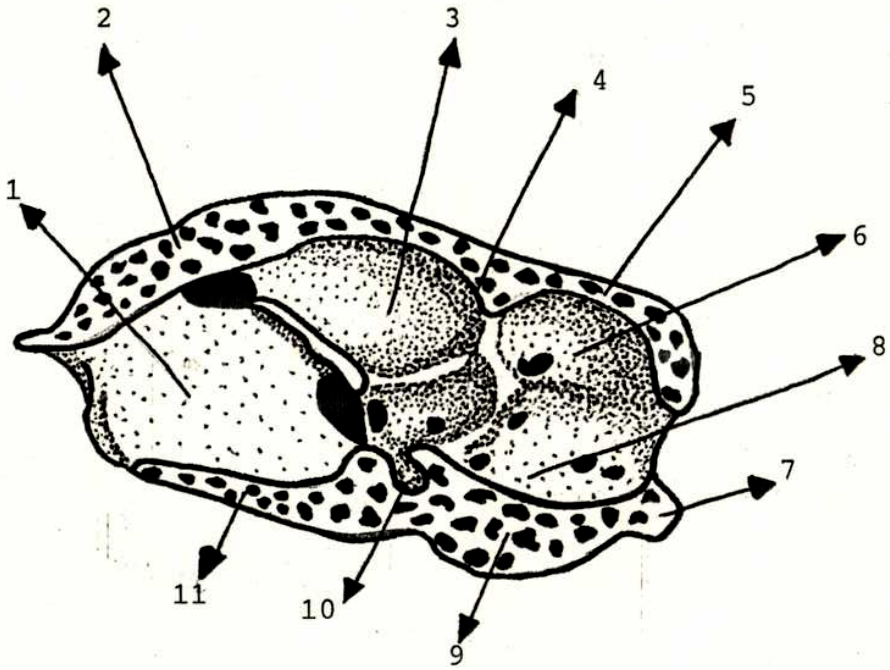

figura n°10: CORTE SAGITAL DEL CRANEO

1. Septo interorbitario - 2. Frontal - 3.Fosa cerebral - 4. Fosa óptica - 5.Parietal - 6.Fosa cerebelosa - 7. Cóndilo del basioccipital - 8.Fosa medular - 9.Basiesfenoides y para esfenoides - 10.Fosa hipofisaria - 11. Rostro para esfenoides. ("Anatomía de la Aves", EDE, D.A. (pag. 106).

ma óptico, separada del resto por una delgada capa que la protege dentro de la fosa hipofisaria y unida al cerebro por el tallo o infundíbulo. (129). (fig.n°11).

Disecada la glándula, se la homogenizó mediante movimientos manuales suaves en un homogenizador Potter vidrio - vidrio, en presencia de 200 µl de solución fisiológica (Cloruro de Sodio 0.9%) y 300 µl de agua destilada.

En un tubo de vidrio alargado de 2 ml. de capacidad se reunieron los homogenatos y los posteriores lavados con agua destilada. Dicho contenido fue centrifugado en una centrífuga clínica a temperatura ambiente, durante 15 minutos a 3000 rpm.

En cada muestra se decantó el sobrenadante y se descartó el precipitado. Luego se liofilizaron los sobrenadantes conservándolos de esta forma hasta su utilización.

1.2 Determinación de la concentración de FSH en extracto de hipófisis

Para la determinación de FSH se utilizó el ensayo homólogo desarrollado por Scanes y col. (130), iodinizando una de las fracciones purificadas de hipófisis de pollo, la denominada DC_3, por reacción frente a su antisuero específico, anti DC_3.

1.2.1. Hormonas hipofisaria de pollo

Las fracciones purificadas se obtuvieron por extracción inicial de las hormonas glicoproteicas del tejido hipofi

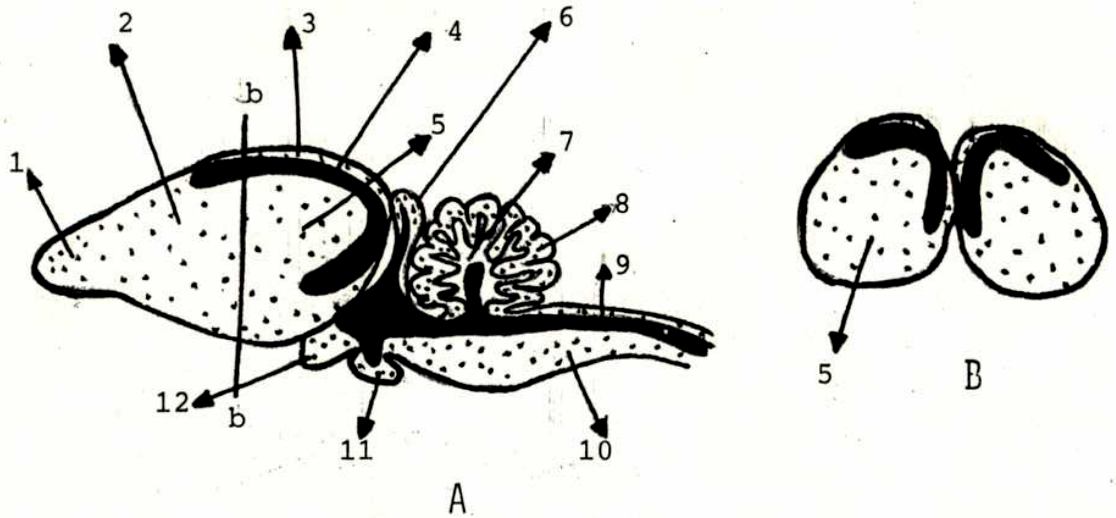

Figura n°11: ESTRUCTURA INTERNA DEL ENCÉFALO

A. Corte longitudinal vertical - B. Corte transversal a nivel b-b.
1.Lóbulo olfatorio - 2. Hemisferio cerebral - 3.Techo del hemisferio - 4. Ventrículo 5.Cuerpo estriado - 6. Glándula pineal - 7. Arbol de la vida - 8.Cerebelo - 9. Techo de la médula oblongada - 10.Suelo de la médula oblongada - 11. Hipófisis - 12.Quiasma óptico.
("Anatomía de las Aves". EDE, D.A. pag. 124).

sario del pollo con Acetato de Amonio 6% (p/v), pH:5.1 en etanol 40% (43).

Se precipitó la fracción glicoproteica (GTN) por el agregado de dos volúmenes de etanol, el precipitado fue lavado dos veces, primero con etanol y luego con eter etílico. Finalmente se llevó el residuo a sequedad.

El extracto seco disuelto en buffer apropiado fue luego sembrado en una columna de intercambio iónico (carboximetil celulosa). De esta manera se lograron separar dos fracciones, la fracción CM_1 (FSH-like) y la CM_2 (LH-TSH), las que fueron purificadas luego por cromatografía en columna de fosfato de calcio y DEAE-celulosa (fracción CP_1).

Se preparó luego con la fracción CP_1,una solución al 0.6% en Acetato de Amonio 0.01M pH:7. Esta solución se sembró en una columna de DEAE-celulosa equilibrada con buffer 0.01M. Se eluyeron fracciones sucesivas utilizando buffer Acetato de Amonio pH:7, a distintas concentraciones 0.09, 0.125, 0.150 y 1.0 M.(131).

Se ajustaron cada una de las fracciones a una concentración de Acetato de Amonio 0.2M y un pH: 5.5 mediante el agregado de una solución de Acetato de Amonio 1M y de Acido Acético diluido. Luego se precipitaron las proteinas con etanol designándose cada fracción sucesivamente con las siglas DC_1 a DC_6.

La fracción más potente es la denominada DC_3, eluí-

da con Acetato de Amonio entre 0.125 y 0.150 M.

Esta preparación utilizada luego como inmunógeno, tracer y standard al aplicar el inmunoensayo homólogo, fue provista amablemente por el Dr. Follet. Universidad de Bristol (Bristol-Inglaterra).

1.2.2. Antisuero

Se utilizó la fracción DC_3 para preparar el antisuero por inmunización de un conejo, para este fin se aplicó la técnica de Vaitukaitis y col. (132), cuya descripción abreviamos, dado que no compete a las tareas desarrolladas en esta tesis, dado que también fue provista amablemente por el Dr. Follet. Universidad de Bristol (Bristol-Inglaterra).

Se utilizan 40 µg de la fracción DC_3 disueltos en una solución salina y se prepara una emulsión con adyuvante completo de Freund (Difco) en una relación 1:2.

El volumen total es aplicado en el dorso del animal mediante inyecciones intradérmicas.

Se reforzó la primera inmunización a las 17° y 23° semanas utilizando 30 µg y 10 µg de la fracción DC_3 respectivamente.

1.2.3. Iodinización

Se marcó la fracción purificada de FSH con $Na^{125}I$ utilizando el método de Cloramina T (132).

Para ello, se hicieron reaccionar 4 µg de la hormona con 0.5 mCi de $Na^{125}I$ y 10 µg de Cloramina T en un volumen

total de 50 µl.

Se estimó el porcentaje de iodo unido a la proteina por electroforesis de la mezcla de reacción en acetato de celulosa.

La $FSH^{125}I$ se separó de la mezcla por cromatografía en columna de Sephadex-G15. Se colectaron fracciones de 1 ml. con igual volumen de diluyente de radioinmunoanálisis, la FSH marcada se encuentra en la fracción 3-4.

1.2.4. Procedimiento

El método utilizado es una típica postprecipitación mediante la técnica del doble anticuerpo (133).

Todas las incubaciones se llevaron a cabo en tubos de de poliestireno descartables.

Los standards y las muestras fueron diluidas con una solución que contiene; Fosfato de Sodio 0.04M, Cloruro de Sodio 0.15 M, Azida sódica 0.1%. EDTA 0.01M y Seroalbúmina bovina 0.5% o un liofilizado de clara de huevo a pH 7.08.

Las diluciones que se realizaron permitieron obtener cantidades variables de standard o material incógnita en un volumen final de 200 µl.

El antisuero se conservó a 4°C, luego de una dilución 1:50. Esta solución en el momento de ser utilizada, se diluyó aún más con un diluyente que contiene suero normal de conejo (1:200) de manera tal de obtener entre un 30% al 50% de FSH marcada unida al anticuerpo, en ausencia de FSH fría.

Cada tubo en estudio lleva 100 µl de esta solución, excepto el blanco, se le añaden 100 µl del diluyente que contiene suero de conejo en relación 1:200.

Se mezcla el contenido de los tubos, se conserva durante toda la noche a 4°C y finalmente se le añade $FSH^{125}I$ (9.000 dpm, 40 pg) en 50 µl de diluyente para guardarlos nuevamente otras 24 hs. a 4°C.

Una vez que reaccionó la hormona marcada se le agrega 50 µl de γ-globulina anticonejo diluida 1:30 y se incuba la mezcla durante 24 hs. a 4°C.

No se obtuvo un aumento de la precisión ni de la sensibilidad del método al aumentar el tiempo de incubación con el antisuero precipitante.

La radiactividad no unida se diluyó por el agregado de 200 µl de disolvente, finalmente los tubos se centrifugan durante 1 hra. a 2000 rpm.

Se descartaron los sobrenadantes y se midió la radiactividad presente en el precipitado en un espectrómetro γ automático.

La proporción de $FSH^{125}I$ unida en ausencia de FSH fría compitiendo se considera el 100% de unión y el resto de los datos se calculan como porcentaje de éste. Los resultados se expresan en ng/pit.

1.3 Determinación de la concentración de LH en extracto de hipófisis

Se utiliza para determinarla el ensayo homólogo desarrollado por Follet y col. (133).

1.3.1. Hormonas hipofisaria de pollo

Al igual que la FSH, la LH se purificó de la glándula hipofisaria del pollo. Con ese fin se utilizó el método de Stockell Hartree y Cunningham. (43).

El mismo consiste en obtener un extracto glicoproteico (GTN) a partir del polvo cetónico de hipófisis, utilizando para ello una mezcla de Amonio y Etanol pH: 5.5; seguido de una cromatografía en carboximetil celulosa (CM-celulosa).

Se obtienen así dos fracciones, la CM_1 y la CM_2, en las que se produce una separación parcial de ambas gonadotrofinas, LH y FSH.

La fracción CM_2 posee actividad de LH y TSH, la misma fue sometida a una nueva purificación a través de cromatografía en DEAE-celulosa y resina Amberlite IRC-50 para obtener finalmente la fracción IRC-2.

El procedimiento seguido fue el siguiente: Se equilibró la columna de DEAE-celulosa con buffer glicina 5mM pH: 9.5, se eluye primeramente el material no absorbido,y la fracción de nuestro interés es eluida luego con el buffer Glicina 5mM pH: 9,5, y Acetato de Amonio 1M, la muestra se recupera del eluido por precipitación con Etanol 80% (v/v).

El precipitado se secó con ayuda de un evaporador rotatorio, se dializó contra agua destilada y se ajustó a pH:5.5

con buffer Acetato de Amonio. Finalmente se precipitaron las proteinas a 4°C por el agregado de etanol frío.

La muestra así obtenida se cromatografío en una columna de Amberlite IRC-50 equilibrada previamente con buffer Fosfato pH: 7.5, que contiene 5 mM de Sodio.

Se eluyó primero la fracción no absorbida y luego la fracción purificada IRC-2 con Acetato de Amonio 1M.

Esta fracción se recromatografió en DEAE-celulosa(0.9 x 30 cm.) según el método de Bates y col. (134); y se obtuvo finalmente la fracción AE_1, que posee una mayor relación Actividad Gonadotrófica: Actividad Tirotrófica que la fracción IRC_2. (133).

Esta fracción fue provista amablemente por el Dr.Follet, B. K. Universidad de Bristol (Bristol-Inglaterra).

1.3.2. Antisuero

Se obtuvo el antisuero contra la preparación de LH purificada denominada IRC_2, también provisto por el Dr.Follet B. K. Universidad de Bristol (Bristol-Inglaterra).

Con este fin, se disolvieron de 4 a 6 mg.de la fracción purificada en 2 ml. de solución salina y 2 ml.de una mezcla de aceite parafina (Marcol 130) y Arlacel A en proporción 9:1 (v/v).

Se emulsifica la muestra por agitación fuerte, se le añaden 4 ml. de una solución de Tween 80 2% (v/v) y se emulsifica nuevamente.

Se introduce el volumen total (4ml.)mediante varias aplicaciones sucesivas por vía intradérmica en la zona dorsal del conejo y se reinyectan 0.5 mg. preparados de la misma forma, 60 días después de la primera aplicación; dos meses después se le aplicó un segundo booster esta vez con 2 mg. de la fracción y en presencia de bentonita. (133).

Se desangró lentamente el conejo, se recolectó y separó el suero que contenía el anti-IRC_2 y se conservó en heladera para ensayos posteriores.

1.3.3. Iodinización

Se marcaron ambas fracciones IRC_2 y AE_1, utilizando el método de Cloramina T (132).

En cada caso se hizo reaccionar 5 µg de hormona con 1 mCi de $Na^{125}I$ (IMS 30, Amersham Internacional Ltd, Bucks. U.K.). La hormona marcada fue separada y purificada por cromatografía en Sephadex G-25 y Concanavalina A-Sepharosa (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden).

1.3.4. Procedimiento

Se hicieron curvas con distintas concentraciones de antisuero y se determinó la concentración óptima a utilizar la hormona marcada.

Las diluciones del standard (20 µl) correspondientes a estas curvas se incubaron durante 24 hs. a 4°C con 20 µl de antisuero diluido 1:400 (diluir la solución de suero de conejo normal) y 20 µl de hormona marcada(5000 cpm). Al finalizar

las 24 hs. se agregaron 20 µl de un suero precipitante anticonejo, a fin de favorecer la separación de el libre del unido.

El precipitado así obtenido se separó por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos. La radiactividad remanente se midió sobre el residuo en un contador de centelleo γ. Los resultados se expresaron en ng/pituitaria.

2. RESULTADOS

En la tabla I se detallan los resultados obtenidos en este punto, concentración de LH y FSH hipofisarios expresados en ng/pituitaria.

Los métodos estadísticos utilizados fueron (135,136).

- Prueba de Bartlett para testear homocedasticidad.
- Anova de un factor para el estudio global.
- Se aplican pruebas a posteriori para diferencias de medias (TUKEY-KRAMER) y STP (SIMULTANEDUS TEST PROCEDUCE).
- Se aplican pruebas de "t" y de Mann Whitney para diferencias de medias.

Observamos un incremento de ambas gonadotrofinas a medida que nos acercamos al nacimiento.

El aumento evidenciado es similar en ambos casos, para LH es de 5:1 y para FSH es de 4:1.

Los valores correspondientes a LH, en este segundo período embrionario, son mayores que los correspondientes a FSH.

Hormona	13 días	15 días	17 días	19 días	R.Nacidos
FSH	96.4±16.1 (10)	201.9±35.5 (10)	232.7±33.9 (10)	365.4±23.8 (10)	398.8±25.5 (10)
LH	226.1±21.2 (10)	512.6±39.7 (9)	659.7±79.7 (10)	1152.0±141.0 (9)	998.0±117.0 (9)

Tabla I: Concentración de LH y FSH en ng/pituitaria ± Error Standard. Los números entre paréntesis indican la cantidad de determinaciones realizadas en cada ensayo. Anova significativo $p<<0.001$ (para FSH y LH).

LH: 17 no es ≠ 19; 19 no es ≠ 21

13 ≠ 15 y 15 ≠ 17 (STP).

FSH: 15 no es ≠ 17; 19 no es ≠ 21

13 ≠ 15 y 17 ≠ 19 (STP).

PUNTO II

CONCENTRACION SERICA DE LH

1. MATERIAL Y METODOS

1.1. Extracción y Preparación de Muestras

Se utilizaron 250 embriones de pollo hembra híbrido doble pechuga, genética Copp de 13, 15, 17 y 19 días del desarrollo y animales recién nacidos.

Los embriones fueron incubados a 38°C, en un incubador humificado marca Alonso, modelo 75 durante los distintos estadíos del desarrollo embrionario.

Los animales se sacrificaron por decapitación. Rápidamente se les extrajo la sangre valiéndonos de la punción intracardíaca.

Las muestras se conservaron a T ambiente hasta la retracción del coágulo, se centrifugaron a 4.000 rpm durante 10 minutos con el objeto de separar el suero de los elementos figurados y finalmente se guardaron a -20°C hasta el momento del ensayo.

1.2. Determinación de la Concentración de LH en suero

En este caso, en forma similar con lo que ocurre con la LH en hipófisis, se empleó para determinarla el ensayo ho-

mólogo desarrollado por Follet y col. (133).

1.2.1. Hormonas Hipofisarias de Pollo

Idem punto I, 1.3.1.

1.2.2. Antisuero

Idem punto I, 1.3.2.

1.2.3. Iodinización

Idem punto I, 1.3.3.

1.2.4. Procedimiento

Idem punto I, 1.3.4.

Es conveniente aclarar que para este caso se utilizaron 100 µl de suero como muestra incógnita y también que se corrigieron las concentraciones del resto de los componentes de la mezcla de reacción a fin de modificar el volumen de cada una a 100 µl.

Los resultados se expresaron en ng/ml de suero.

2. RESULTADOS

En la tabla II se detallan los resultados obtenidos, concentración de LH en suero expresados en ng/ml.

Los métodos estadísticos empleados fueron los mismos detallados en el punto I, 2.

Los ensayos fueron realizados en suero de animales sacrificados en dos períodos estacionales diferentes, durante los meses de "verano" (octubre-marzo) y de "invierno" (mayo -

agosto).

El objeto de estas determinaciones diferenciales fue el de comprobar si había fluctuaciones estacionales de esta hormona durante el desarrollo embrionario, dado que este evento ocurría en pollos sexualmente maduros.

Observamos que en general, desde el punto de vista estadístico, no hay diferencias significativas en la concentración de LH durante los meses de "verano" y de "invierno".

Ambas curvas presentan un perfil muy similar, el día 19 es un máximo para las dos.

	13 días	15 días	17 días	19 días	R. Nacidos
Invierno	1.12±0.01 (3)	1.90±0.20 (5)	1.80±0.025 (5)	3.20±0.15 (5)	0.95±0.07 (6)
Verano	1.99±0.19 (3)	2.34±0.22 (5)	1.74±0.20 (6)	2.72±0.36 (5)	2.05±0.55 (6)

Tabla II: Concentración de LH en suero de embrión de pollo durante la temporada de "verano" e "invierno". Expresados en ng/ml ± error standard. Los números entre paréntesis indican cantidad de determinaciones. Anova significativo $p<<0.001$ (para LH "verano"e"invierno")

PUNTO III

CONTENIDO DE PROGESTERONA EN AMBOS OVARIOS

1. MATERIAL Y METODOS

1.1. Extracción y Preparación de Muestras

Se utilizaron 500 embriones de pollo híbrido doble pechuga, genética Copp, en los estadíos de 13, 15, 17 y 19 días del desarrollo y pollos recién nacidos.

Los huevos se mantuvieron durante el desarrollo, en un Incubador marca Alonso SRL, modelo n°75, a 37-38°C y en atmósfera humidificada.

Los animales se sacrificaron por decapitación y se mantuvieron sobre hielo durante el intraoperatorio. Se les disecó el ovario izquierdo y el derecho por separado.

Los tejidos se colocaron en pools, se pesaron y homogenizaron en un homogenizador Potter-Elvenjem, en presencia de 2,5 ml. de una mezcla de etanol-agua 20:80 (v/v).

A cada muestra se le añadió Progesterona-^{14}C como tracer, a fin de controlar posibles pérdidas (Ae: 57,2 mCi/mmol).

El homogenato fue extraído 4 veces con 6 ml. de Cloruro de Metileno.

El extracto total se llevó a sequedad con atmósfera de N_2, se redisolvió en 3 ml. de metanol y se conservó durante

toda la noche a 4°C, para la extracción de la grasa (defating)

Transcurridas doce horas aproximadamente, las muestras se filtraron a través de vidrio frito. El filtrado se evaporó bajo N_2 hasta sequedad y en estas condiciones se conservó en heladera hasta su utilización.

1.2. Determinación del Contenido Endógeno de Pg

Este punto merece especial atención, dado que fue en nuestro laboratorio donde se realizó la puesta a punto del método para la determinación de esteroides por cromatografía líquida de alta presión.

La mayoría de los métodos competitivos para la determinación de esteroides endógenos son muy sensibles (138, 139), pero para este tipo de tejidos fue necesario utilizar procedimientos de separación previos para obtener resultados más específicos.

El extracto seco conservado en heladera fue suspendido en metanol-agua, 70:30 (v/v) y en estas condiciones fue inyectado en el cromatógrafo para la separación de los esteroides.

1.2.1. Aparato

El aparato utilizado fue un cromatógrafo líquido de alta presión Waters Associates, modelo 6000A. un inyector modelo U6K y un detector de absorvancia modelo 440, para monitorear los eluidos a 254 nm.

La columna está empaquetada con una fase de unión μ-Bondapack C18 (las partículas de sílica están unidas con octa-

desilano) (140, 141).

Para determinar el "lag"de colección (tiempo necesario para que una cantidad ideal de fase móvil avance a través del volumen de la columna a una dada velocidad de flujo), la columna fue lavada con 40 ml. de agua y 50 ml. de metanol, durante este último lavado se inyectó tres veces con 1 ml.de Dimetilsulfóxido.

Entre cada determinación se lavó la columna con metanol, cloruro de metileno y hexano, con el objeto de eluir lípidos y compuestos no polares, eventualmente retenidos en la columna luego de una corrida.

Se chequeó la eficiencia de la columna hasta constancia entre la reducción de la altura del plato teórico, la velocidad y el parámetro de resistencia de la columna.

Las determinaciones se llevaron a cabo a T ambiente y se mantuvo constante la temperatura de la columna, colocándola en un recipiente aislante.

1.2.2. Fase móvil

La fase móvil utilizada fue metanol-agua, 70:30(v/v) (142), ésta se empleó para determinar la eficiencia de la columna, el "lag" de colección (Lc) y las curvas de calibración.

Se utilizaron además otras fases móviles (Tabla III) con el objeto de determinar el grado de pureza de las fracciones recolectadas entre ellas mencionaremos metanol-agua(50:50) metanol, acetonitrilo, acetonitrilo-agua (85:15) (143).

Fase móvil	Indice Polaridad
Metanol	6.6.
Metanol-agua (50:50)	7.8
Metanol-agua (70:30)	7.3
Acetonitrilo	6.2
Acetonitrilo-agua (85:15)	6.6.

Tabla III: Ixy = Vx Ix + Vy Iy.

Vx y Vy = fracciones volumétricas de los componentes x,y en la fase móvil.

Ix y Iy = índice de polaridad de los componentes x, y de la fase móvil. (146).

1.2.3. Esteroides

La Pg radionerte utilizada provenía de Sigma Chemicals.

Los esteroides radioactivos eran de New England Nuclear. Previo a ser utilizados se les testeó la pureza mediante cromatografía en papel en los sistemas Tolueno-Propilenglicol (144) y Bush A (145).

1.2.4. Velocidad de Flujo (Fr)

Se utilizó una velocidad de 0.2 ml/min. para la colección de fracciones provenientes de la inyección de muestras impurificadas y un flujo de 1 ml/min. para la determinación de

muestras puras, provenientes del reciclado de las fracciones colectadas y estas fueron utilizadas para la cuantificación de esteroides.

Se determinó el Lc para velocidades de flujo de 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 3.0 ml/min.

1.2.5. Velocidad de Carta (R)

Para la colección de fracciones de muestras impuras se utilizó una velocidad de 12.5 cm/min. y para el resto de las corridas 2 cm/min.

1.2.6. Determinación del Lag de Colección

Este punto fue desarrollado enteramente por el Lic. Eduardo N. Cozza, por lo tanto se encontrará descripto en detalle en Cozza y col (137).

1.2.7. Procedimientos

Los extractos metanólicos acuosos de las muestras biológicas se inyectaron directamente en el cromatógrafo, el pasaje de las muestras impuras por la columna del aparato mostró un cromatograma con las características del de la fig. n° 12.

Estos cromatogramas fueron expandidos y el pico de Pg se colectó, luego de determinar el Lc, como se indica en la fig. n°13 desde A hasta B.

La pureza de cada fracción fue determinada recromatografiando las fracciones secuencialmente en 5 fases móviles diferentes (Tabla III).

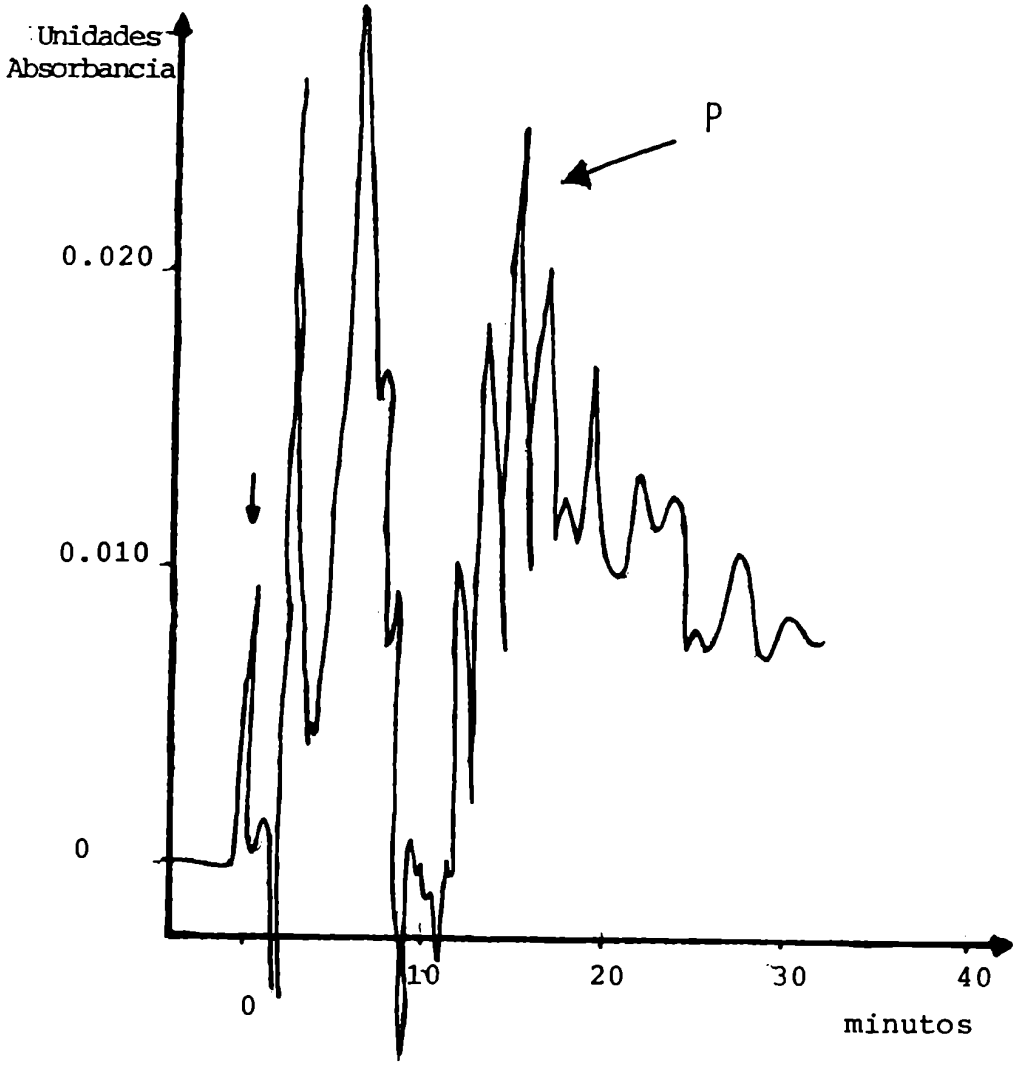

figura n°12: Cromatografía correspondiente al tejido adrenal de embrión de pollo de 19 días del desarrollo.
P: Pico progesterona - sv: metanol - agua (70:30).
(Cozza y col. 137, pag. 516)

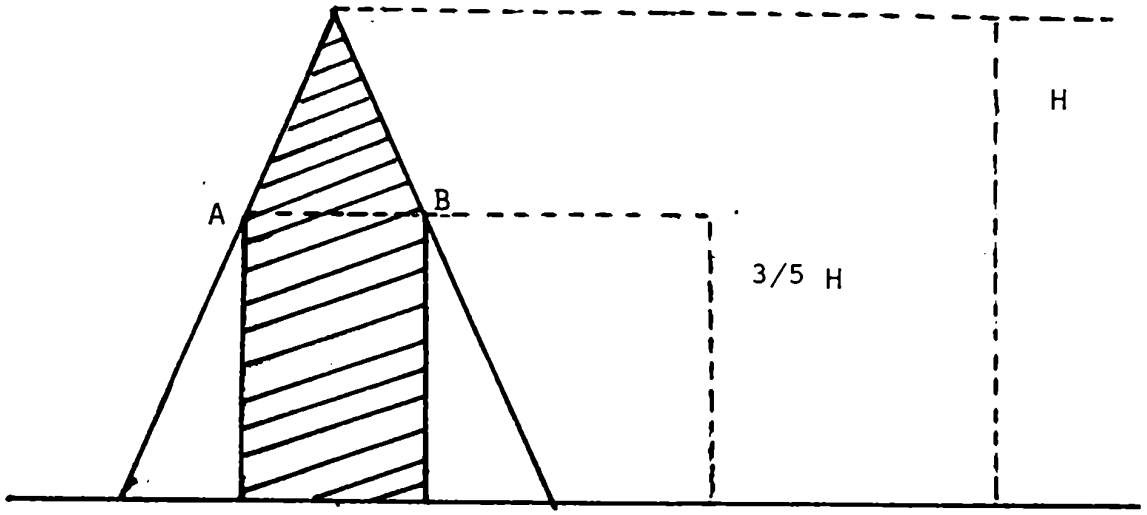

figura n°13: Determinación de Lc, como promedio de los intervalos entre el gráfico del aparato y el gráfico de dpm vs fracción colectada. (Para mayores detalles, ver Cozza y col. cita n°137, pag. 514).

Zona colectada del pico de los cromatogramas

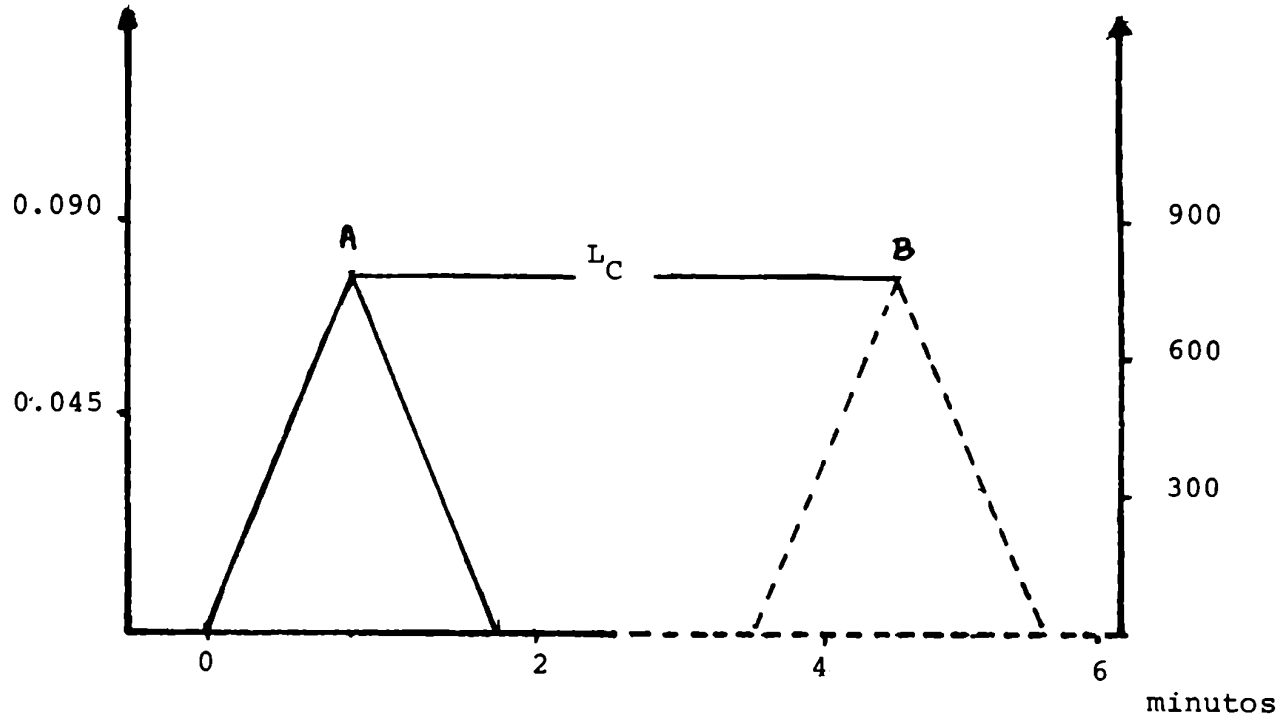

Figura n°13: Determinación de Lc, como promedio de los intervalos entre el gráfico del aparato y el gráfico de dpm Vs fracción colectada. (Para mayores detalles, ver Cozza y col. cita n°137, pag. 514).

El material que se empleó para cuantificar fue el obtenido luego del último paso cromatográfico (Sistema 6, Tabla IV).

En todas las fases móviles sólo se obtuvo un pico, cuyas características eran similares a las de la fig. n°14, el material correspondiente a ese pico exhibió actividad específica constante (ver tablas IV y V y Resultados).

N° Sistema	Fase Móvil	Abreviatura	Ae (dpm/mg)
1	Metanol-agua (70:30)	MW	32.364 + 281 *
2	Metanol	M	37.815 + 237
3	Acetonitrilo-agua (85:15)	AW	38.038 + 201
4	Acetonitrilo	A	38.002 + 144
5	Metanol-agua (50:50)		38.126 + 294
6	Metanol-agua (70:30)		38.038 + 172

Tabla IV: Actividad específica (dpm/ng) obtenida recromatografiando la fracción Pg de la fig.n°12 secuencialmente en 5 fases móviles distintas. El sistema es utilizado para cuantificar la fase móvil* y Ae originales de la fracción Pg de la fig. n°12.

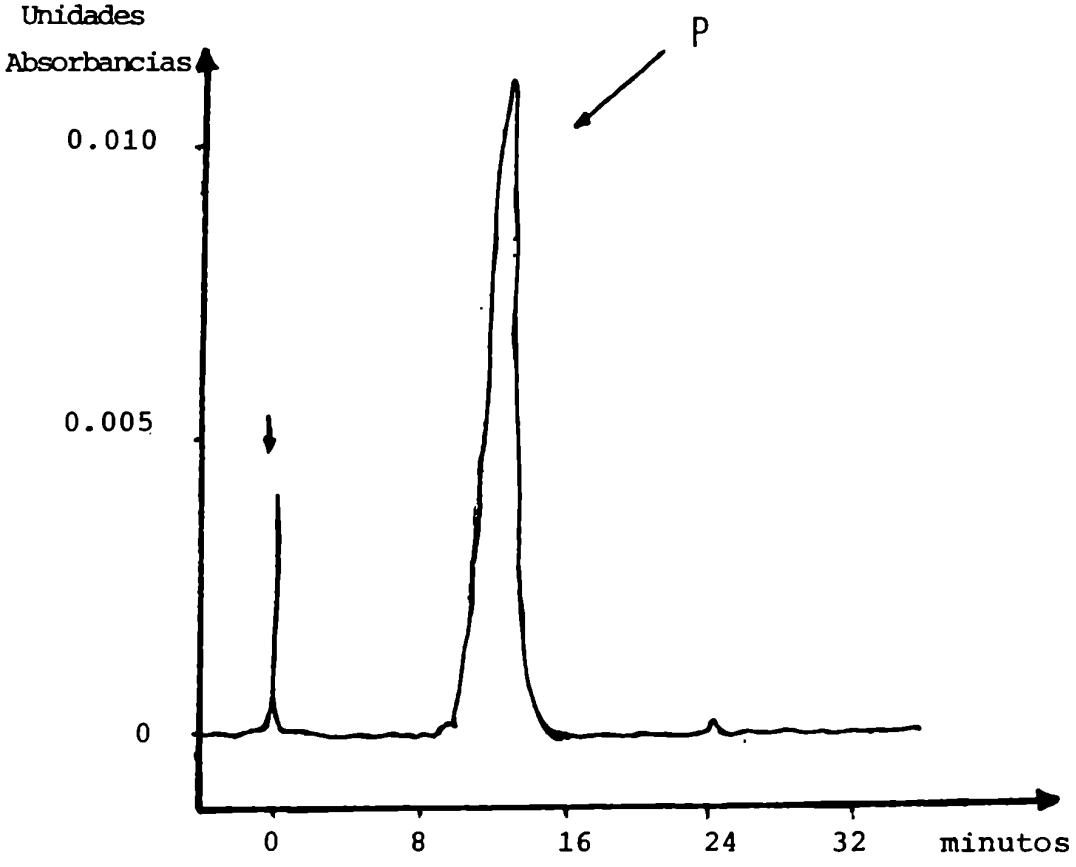

figura n°14: Cromatograma obtenido cuando, el pico de progesterona eluido del cromatograma de la fig.n°12, es reciclado en acetonitrilo-agua (85:15). (Segunda recromatografía secuencial). (Cozza y col, 137, pag. 516).

N°Sistema	Activ.específica Pg
1	751.2 + 50.4
2	714.3 + 38.6
3	689.1 + 62.2
4	699.6 + 26.4
5	702.4 + 40.8
6	697.8 + 23.1

Tabla V: Ae (dpm/mg).

Obtenida del uso secuencial de 5 fases móviles para recromatografiar los picos. Su equivalencia en el n° del sistema se indica en la Tabla IV.

La radiactividad obtenida se midió en un contador de centelleo líquido en presencia de 10 ml. de una solución de 0.4 gs/ℓPPO + 0.25 gs/ℓdimetil POPOP en 1 lt. de Tolueno destilado (147).

Se determinó la masa de los esteroides por su absorvancia a 254 nm, utilizando metanol-agua como solvente de elución, el cálculo se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$Sm = S \times \frac{(SA° - SA)}{(SA° \times SA)}$$

donde:

Sm = masa del esteroide en ng.

S = tracer de Pg radiactiva en dpm.

SA°= Ae del tracer en dpm/ng.

SA = Ae de cada fracción colectada en dpm/ng

1.2.8. Curvas de calibración. Sensibilidad

Se realizaron curvas de calibración inyectando distintas cantidades de una solución de Pg radionerte y cromatografiándolos en todas las fases móviles citadas en tabla III.

La fig. n°15 muestra una curva de calibración obtenida con metanol-agua. La curva es lineal entre 0 y 0.465 unidades de absorbancia. Los valores de absorbancia corresponden a valores de las muestras biológicas que se encuentran en la zona lineal.

El límite de identificación obtenido es de 0.5ng por muestra.

2. RESULTADOS

2.1. Metodológicos

2.1.1. Resolución y Pureza de los Esteroides Aislados.Cuantificación

La fig. n°12 muestra el cromatograma obtenido correspondiente a tejido adrenal de embrión de pollo.

El procedimiento empleado nos permite una colección eficiente de la Pg pura, esteroide en el que estamos interesados en estas determinaciones.

La utilización del procedimiento de purificación por reciclado de las muestras en otra fase móvil ha dado una mayor pureza y mejor resolución, la fig.n°14 muestra el cromato

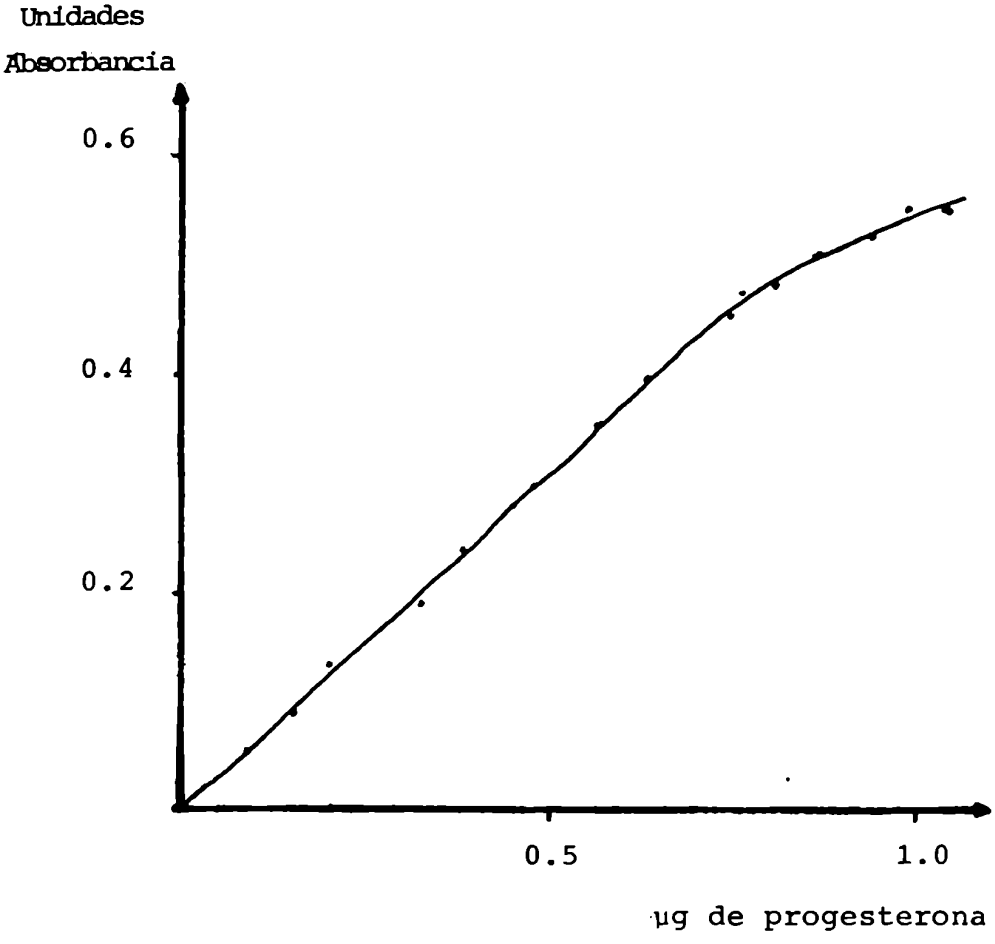

figura nº15: Curva de calibración, obtenida de cromatografía standars de Progesterona en metanól-agua (70:30).

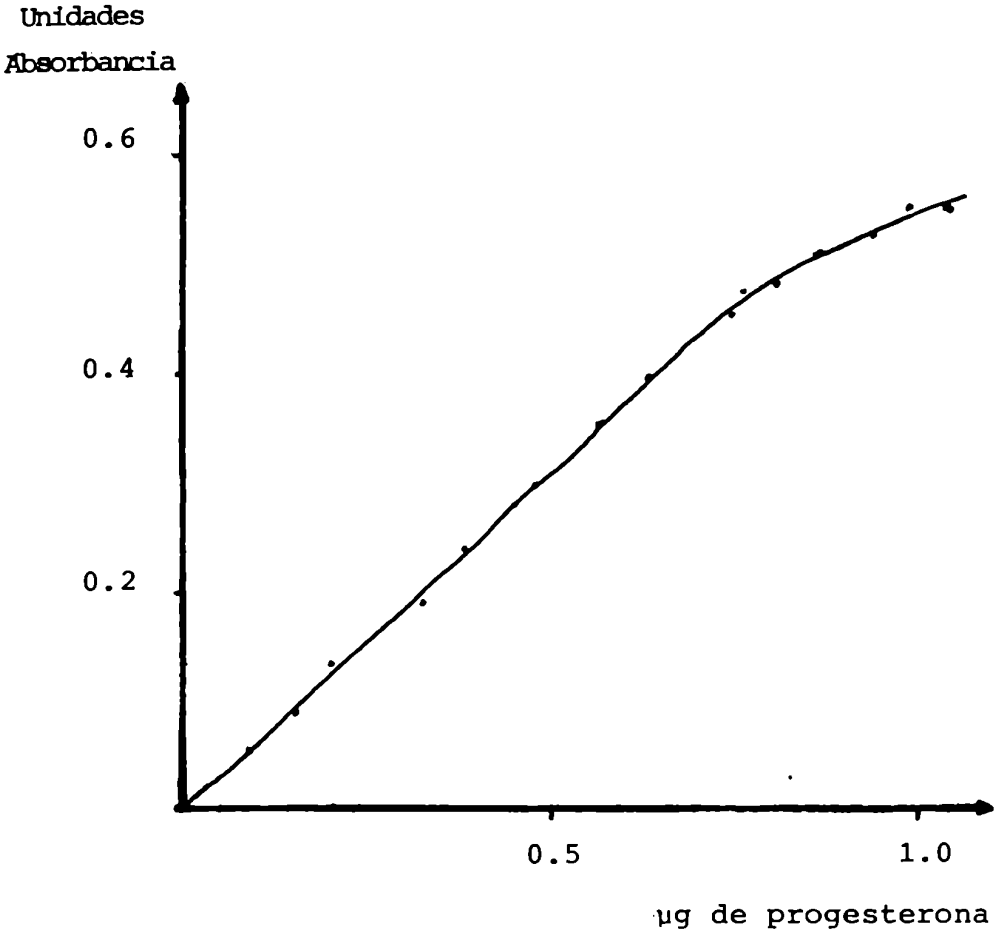

figura n°15: Curva de calibración, obtenida de cromatografía standars de Progesterona en metanól-agua (70:30).

grama obtenido cuando la fracción Pg aislada se recromatografió por segunda vez (AW 85:15) (sistema 3).

El sistema 6, el último de la secuencia es utilizado para cuantificar el esteroide.

La tabla IV muestra las actividades específicas obtenidas por este procedimiento, podemos observar que se consigue constancia de la actividad, ya en el sistema 2.

2.1.2. Recuperación cuantitativa

La tabla VI denota que el método empleado nos permite recuperaciones cuantitativas.

Fc (ml/min)	Lc	dpm agregado	dpm recuperado	%
0.1	228	44.600	44.600	100.0
0.2	114	44.600	44.600	100.0
0.5	45.6	44.600	44.600	100.0
1.0	22.8	44.600	44.511	99.8
1.5	15.2	44.600	44.422	99.6
2.0	11.4	44.600	44.332	99.4
3.0	7.6	44.600	44.243	99.2

Tabla VI: Recuperación de los standards (0.02 µCi en 20 µl de ^{14}C-Corticosterona), obtenida al calcular el Lc en 1.2.6.

2.2. Bioquímicos

La tabla VII muestra los valores de Pg endógena en ovario izquierdo y derecho en los distintos estadíos, expresados en ng/mg de tejido.

Los métodos estadísticos utilizados fueron los mismos detallados en el punto I 2.

Tanto el ovario izquierdo como el derecho, comienzan con niveles relativamente altos en el día 13, y descienden luego hacia el estadío de 17 días.

Se observa un importante incremento en el contenido de Pg en ambos ovarios en el día 19, estadío próximo al nacimiento.

La concentración de progesterona endógena en ambos ovarios es semejante.

Tejido	13 días	15 días	17 días	19 días	R.Nacidos
O. Der.	3.90±0.24	4.64±0.36	1.37±0.10	10.76±1.20	4.29±0.39
O. Izq.	4.53±0.28	1.93±0.19	1.87±0.19	8.64±0.47	4.26±0.43

Tabla VII: Concentración de Pg (ng/mg tejido) en ovario izquierdo y derecho durante el desarrollo embrionario.
Anova significativo, $p \ll 0.001$ para ambos ovarios.
El día 19 es un máximo para ambos .
O.I.: 13≠15 (STP). O.D.: 15≠17 (STP).

PUNTO IV

CONCENTRACIONES SERICAS DE ESTRADIOL Y PROGESTERONA

1. MATERIAL Y METODOS

1.1. Extracción y Preparación de Muestras

Se utilizaron 500 embriones de pollo hembra híbrido, doble pechuga, genética Copp en los estadíos de 13, 15, 17, y 19 días y pollos recién nacidos.

Los embriones fueron incubados en un incubador humidificado a 36-37°C, marca Alonso SRL, modelo n°75 durante el proceso del desarrollo. Los animales fueron sacrificados por decapitación y rápidamente se procedió a la extracción de la sangre mediante punción intracardíaca.

Las muestras se conservaron a T ambiente hasta que se produce la retracción del coágulo, finalmente se separó el suero de los elementos figurados por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos.

1.2. Determinación de Pg

La Pg se determinó por radioinmunoensayo por el método de Abraham, G. E. y col (148).

1.2.1. Buffer

Se utilizó Fosfato pH: 7.0 constituído por;

PO_4Na_2H 0.04M | Cloruro de Sodio 0.154M

Gelatina 0.1% | $PO_4NaH_2 \times H_2O$ 0.34M

Azida Sódica 0.1%

1.2.2. Esteroides

La Pg cristalina se obtuvo de Steraloids Inc.Wilton, NH, USA. Se conservó en una solución madre de 16 µg/ml a 4°C. La 1,2 (n) ^{3}H-Pg se obtuvo de NEN Co, Boston, Massachusetts; posee una actividad específica de 55.0 Ci/mmol. La solución stock contiene 55.000 dpm/µl en benceno. Se utilizó una solución de 10.000 dpm/100 µl en cada ensayo.

1.2.3. Antisuero

El antisuero utilizado fue el anti 4pregnen-3,20-diona 3-CMO:BSA provisto amablemente por los Dres.Pirke y Doerr (Max Planck Institute, München, Alemania Occidental).

Se utilizó una dilución 1:4000 de la solución original, de manera de obtener aproximadamente un 50% de unión a la 1,2(n) ^{3}H-Pg.

Se obtuvo reacción cruzada con los siguientes compuestos:Pregnenolona (1.46%), 17OHPg (0.089%), 11DOC (6.6%),T (0.17%), 11βOH-Pg(5.4%), 5α y 5β-Pregnanodiona(15.6% y 6.7%).

1.2.4. Procedimiento

Cada muestra de suero de 200 µl se extrajo dos veces con 2 ml. cada una de eter etílico purificado. Luego de estas extracciones se recupera del orden del 85% de las hormonas esteroides.

PO_4Na_2H 0.04M Cloruro de Sodio 0.154M

Gelatina 0.1% $PO_4NaH_2 \times H_2O$ 0.34M

Azida Sódica 0.1%

1.2.2. Esteroides

La Pg cristalina se obtuvo de Steraloids Inc.Wilton, NH, USA. Se conservó en una solución madre de 16 µg/ml a 4°C. La 1,2 (n) ^{3}H-Pg se obtuvo de NEN Co, Boston, Massachusetts; posee una actividad específica de 55.0 Ci/mmol. La solución stock contiene 55.000 dpm/µl en benceno. Se utilizó una solución de 10.000 dpm/100 µl en cada ensayo.

1.2.3. Antisuero

El antisuero utilizado fue el anti 4pregnen-3,20-diona 3-CMO:BSA provisto amablemente por los Dres.Pirke y Doerr (Max Planck Institute, München, Alemania Occidental).

Se utilizó una dilución 1:4000 de la solución original, de manera de obtener aproximadamente un 50% de unión a la 1,2(n) ^{3}H-Pg.

Se obtuvo reacción cruzada con los siguientes compuestos:Pregnenolona (1.46%), 17OHPg (0.089%), 11DOC (6.6%),T (0.17%), 11βOH-Pg(5.4%), 5α y 5β-Pregnanodiona(15.6% y 6.7%).

1.2.4. Procedimiento

Cada muestra de suero de 200 µl se extrajo dos veces con 2 ml. cada una de eter etílico purificado. Luego de estas extracciones se recupera del orden del 85% de las hormonas esteroides.

Los extractos etílicos fueron evaporados hasta sequedad bajo campana y una vez secos fueron redisueltos con 500 µl de buffer y agitados vigorosamente.

Los tubos de la curva standard y los de las muestras se ensayaron por duplicado cuatriplicado respectivamente.

Cada tubo de poliestireno "muestra" contenía 200 µl del extracto anterior y los de la curva standard contenían 100 µl de las siguientes concentraciones de Pg cristalina; 12.5,25, 50, 100, 200, 400, 600, y 800 pg/100 µl.

A cada uno de estos tubos se les añadió 100 µl de 1,2 (n) ^{3}H-Pg, 100 µl del antisuero y se completó el volumen a 500 µl con buffer.

Luego de agitar vigorosamente la mezcla de reacción, se conservó en heladera durante toda la noche.

Para determinar el porcentaje de esteroide-^{3}H unido al anticuerpo se preparó tubos designados con las siglas Pg, O y B.

Los tubos Pg (denotan la cantidad total de radiactividad agregada) contiene 100µl de una solución de 1,2(n)-^{3}H-Pg y 0.6 ml. de buffer; los tubos O(indican la cantidad de hormona radiactiva unida por la dilución utilizada del antisuero) contienen 100 µl de antisuero, 100 µl de una solución de 1,2(n)^{3}H-Pg y 300 µl de buffer; y finalmente los tubos B (demuestran la presencia de uniones no específicas) contienen 100 µl de una solución 1,2(n)^{3}H-Pg y 400 ul de buffer.

Los extractos etílicos fueron evaporados hasta sequedad bajo campana y una vez secos fueron redisueltos con 500 µl de buffer y agitados vigorosamente.

Los tubos de la curva standard y los de las muestras se ensayaron por duplicado cuatriplicado respectivamente.

Cada tubo de poliestireno "muestra" contenía 200 µl del extracto anterior y los de la curva standard contenían 100 µl de las siguientes concentraciones de Pg cristalina; 12.5,25, 50, 100, 200, 400, 600, y 800 pg/100 µl.

A cada uno de estos tubos se les añadió 100 µl de 1,2 (n) ^{3}H-Pg, 100 µl del antisuero y se completó el volumen a 500 µl con buffer.

Luego de agitar vigorosamente la mezcla de reacción, se conservó en heladera durante toda la noche.

Para determinar el porcentaje de esteroide-^{3}H unido al anticuerpo se preparó tubos designados con las siglas Pg, O y B.

Los tubos Pg (denotan la cantidad total de radiactividad agregada) contiene 100µl de una solución de 1,2(n)-^{3}H-Pg y 0.6 ml. de buffer; los tubos O(indican la cantidad de hormona radiactiva unida por la dilución utilizada del antisuero) contienen 100 µl de antisuero, 100 µl de una solución de 1,2(n)^{3}H-Pg y 300 µl de buffer; y finalmente los tubos B (demuestran la presencia de uniones no específicas) contienen 100 µl de una solución 1,2(n)^{3}H-Pg y 400 ul de buffer.

Luego de incubar toda la noche se les agregó a cada tubo excepto a los tubos Pg, 200 µl de una suspensión de Carbón (Norit A)-dextrano (T 70) enfriada a 4°C (0.5%-0.05%) en 100 ml. de buffer.

El contenido de cada tubo se agitó vigorosamente y se incubó otros 10 minutos a 4°C. Finalmente se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos con el objeto de separar el libre del unido.

El sobrenadante, que contiene la fracción unida, se decantó en viales de poliestireno a los que se les añadió 0.5 ml. de Dioxano y 2.5 ml. de una solución centellante (4 gs de PPO y 0.25 gs. de Dimetil POPOP por litro de Tolueno).

La radiactividad se midió durante un minuto en un contador de centelleo líquido marca Packard.

Los resultados se expresaron en ng/ml.

1.3. Determinación de 17β-Estradiol

El método empleado en este ensayo fue una modificación de Abraham y col. (149).

1.3.1. Buffer

Idem punto IV, 1.2.1.

1.3.2. Esteroides

El E_2 cristalino (1,3,5(10)Estradien-3,17βdiol)se obtuvo de Steraloids Inc, Wilton, NH U.S.A., se preparó y conservó en una solución madre de 16 µg/ml.

El 2,4,6,7 (n)^{3}H-E_2 se obtuvo de NEN Co, Boston, Ma

ssachusetts, posee una actividad específica de 87Ci/mmol. La solución contenía 25.000 dpm/µl en etanol-benceno.

Se utilizaron 10.000 dpm/100 µl en cada ensayo.

1.3.3. Antisuero

La preparación de este antisuero se realizó utilizando conejos adultos macho.

Se disolvieron 2,5 mg. del conjugado 1,3,5(10)Estratrien, 3,17βDiol-6ona CMO:BSA.Steraloids Inc. Wilton, NH, USA en un ml. de solución salina (Cloruro de Sodio 0.9%), una vez disuelto se mezcló con igual cantidad de Adyuvante completo de Freund (Difco Lab. Detroit, Michigan) y se agitó vigorosamente hasta formar una emulsión.

Un ml. de esta emulsión se administró por inyección subcutánea al dorso de los conejos mediante varias aplicaciones de 0.1 ml.

A la tercer semana se les extrajo sangre de las orejas y se ensayaron los títulos respectivos. Como estos aún permanecían bajos se les aplicó una segunda inyección conteniendo esta vez 1 mg. del conjugado y adyuvante incompleto.

Una vez que se obtuvo el título deseado se procedió a sangrar los conejos con el fin de extraer el antisuero.

El sangrado se realizó administrando al conejo por vía endovenosa (vena marginal de la oreja) una mezcla de 2.5mg. de droperidol y 0.05 mg. de fentanil (Innovan, Jonhson & Jonhson) en dosis fraccionadas en un total de 10 ml. El procedimien

to se llevó a cabo con un tubo de silastic de 1 mm. de diámetro, a través del cateterismo de la vena yugular y de la vena cava del hígado, hasta la muerte del animal.

La sangre recogida fue conservada a Temperatura ambiente hasta que se produjo la retracción del coágulo para separar luego el suero por centrifugación.

El antisuero se utilizó luego con una dilución 1: 10.000, que da aproximadamente 50% de unión al $^{3}H-E_2$.

Se determinó la reacción cruzada por el método de Abraham (150), cuyo resultado fue; menor del 1% para $17\alpha-E_2$, Estriol, 16-epiestriol y 16,17-epiestriol y menor del 6% para E_1.

1.3.4. Procedimiento

En general el método utilizado es el mismo que en el punto 1.2.4., salvo las consideraciones que más adelante se detallan.

El volumen de suero utilizado para las posteriores extracciones con eter fue de 500 µl. Los extractos se tomaron con 300 µl de buffer y la totalidad de ese volumen fue utilizado para el radioinmunoanálisis, por lo que a los tubos "muestra" no le fue necesario el agregado de buffer para llevar a volumen.

El resto de las condiciones fueron mantenidas.

Los resultados se expresaron en pg/ml.

2. RESULTADOS

La tabla VIII muestra los resultados obtenidos, concentración de Pg y E_2 séricos expresados en ng/ml.

Los métodos estadísticos empleados fueron los descriptos en el punto I 2 de este capítulo.

EN el caso del estradiol, se observa un aumento rápido y continuo desde el estadío más temprano estudiado y hacia el nacimiento.

El perfil que se observa para Progesterona sérica es aproximadamente constante en esta segunda mitad del período de incubación, y las concentraciones correspondientes a ésta hormona son siempre mayores que las de estradiol séricos.

Esteroide	13 días	15 días	17 días	19 días	R.Nacidos
Pg	2.72±0.88 (4)	3.00±0.54 (5)	2.45±0.29 (7)	2.50±0.49 (6)	2.40±0.53 (5)
E_2	0.91±0.04 (6)	1.08±0.06 (6)	1.24±0.06 (6)	1.45±0.05 (6)	1.33±0.07 (6)

Tabla VIII: Concentración en ng/ml.de Pg y E_2 séricos ± error standard durante el desarrollo embrionario.El n° entre paréntesis indica el número de determinaciones por estadío.

Pg: Anova no significativo

E_2: Anova significativo $p<<0.001$. 13 no es ≠ 15; 13 y 15 son ≠ de 17,19 y 21; no hay diferencia entre 17,19,21.

PUNTO V

ESTIMULACION "IN VITRO" DE LA SINTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES OVARICAS

1. MATERIAL Y METODOS

1.1. Extracción y Preparación de muestras

Se utilizaron 250 embriones de pollo hembra, genética Copp de 13, 15, 17, 19 días y recién nacidos.

Los animales se sacrificaron por decapitación.El procedimiento de disección de los ovarios se realizó sobre hielo

Para extraer las glándulas, se hizo un corte sagital desde la cloaca al esófago, se abrieron ambas mitades y se separaron el intestino, el hígado, la vesícula y el estómago hasta encontrar los ovarios, los cuales yacen debajo y delante de los riñones, en su mayor parte a la izquierda del raquis, fijados en esa posición por el ligamento mesovárico y tejido conectivo. Se relaciona por delante con los pulmones, el diafragma,el hígado y el intestino anterior y por detrás con el oviducto y las asas intestinales. (fig. n°16).

Los ovarios se cortaron en mitades y se conservaron sobre hielo hasta el momento de la incubación.

1.2. Estimulación in vitro por LH ovina (LHo)

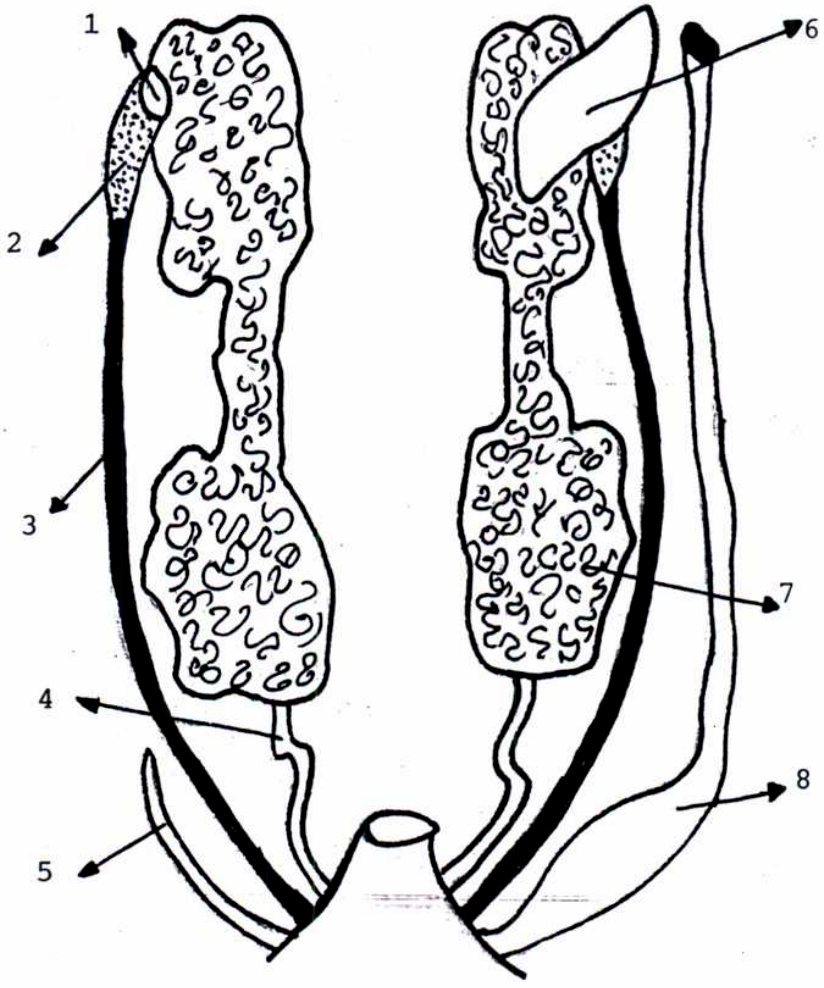

figura n°16: SISTEMA URINARIO Y REPRODUCTOR DEL EMBRION DE POLLO HEMBRA

1.Gonada derecha atrofiada - 2.Mesonefros que se atrofia - 3.Conducto mesonéfrico que se atrofia - 4.Uréter - 5.Vestigios del conducto de Muller derecho - 6.Ovario - 7.Metanefro 8.Oviducto.

1.2.1. Hormona

Se utilizó para este ensayo LHó provista amablemente por la Dra. Dufau, María, N.I.H. Bethesda, M.O, U.S.A.

La hormona fue disuelta en buffer fosfato (Idem punto IV 1.2.1.), y fraccionada en alícuotas de 50 µl (1 µg), luego se guardaron congeladas a -20°C hasta el momento de su utilización.

Inmediatamente antes de cada experimento, se descongela una alícuota y se prepara una dilución apropiada de manera de tener una concentración final en el medio de incubación de 20-25 ng/ml.

1.2.2. Procedimiento de Incubación

Las incubaciones se realizaron en vasos de precipitado de 10 ml. Kimax, en un incubador metabólico Dubnoff a 37° C, con agitación constante de 40 ciclos/min.

Se desarrolló por espacio de dos horas, tomando la precaución de realizarla bajo atmósfera de carbógeno (95% O_2 + 5% CO_2).

El volumen final de incubación fue de 2 ml., el buffer de incubación utilizado fue el Krebs-Ringer-Bicarbonato-Glucosa, cuya constitución es la siguiente:

100 ml. de ClNa 0.9%	
4 ml. de ClK 1.15%	1,63 ml. a cada incubado
1 ml. de PO_4H_2K 2.11%	
1 ml. de $SO_4Mg \times 7H_2O$ 3.82%	

89.6 mg. de dextrosa en 4 ml. CO_3HNa 1,29% 0.16 ml.a c/incubado

Cl_2Ca 1,22% 0.05 ml.a c/incubado.

Al término de la incubación se aspiró el medio y se conservó el mismo a -20°C hasta su utilización.

1.2.3. Radioinmunoensayo de Pg y E2

Estos ensayos fueron realizados de acuerdo a los métodos descriptos en los puntos IV 1.2 y 1.3, con una salvedad, no fueron necesarias las extracciones con eter dado que se utilizó el medio aspirado luego de la incubación, y los volumenes utilizados en ambos casos fueron de 100 y 200 µl respectivamente.

Los resultados se expresaron en ng/ml y pg/ml para Pg y E_2 respectivamente.

2. RESULTADOS

La tabla IX muestra los resultados aquí obtenidos, los valores tabulados corresponden a lo que dimos en llamar "grado de estimulación" (Ge), que es el cociente entre la concentración de los esteroides producidos en presencia y en ausencia de hormona estimuladora (Ej. $Ge = \frac{(Pg) \text{ con LHo}}{(Pg) \text{ sin LHo}}$

Los métodos estadísticos empleados fueron los descriptos en el punto I 2. de este capítulo.

Tanto el ovario izquierdo como el derecho responden

a la estimulación "in vitro" por LH en todos los estadíos estudiados, sin embargo esta respuesta es diferente para ambos tejidos.

Se observan valores altos de Ge para E_2 en ambos ovarios en el estadío más temprano estudiado. En el caso del OI este valor cae rápidamente y se recupera lentamente hacia el nacimiento, mientras que en el OD la disminución es más suave y permanece luego más o menos constante.

Al considerar la respuesta de Pg a la estimulación, en el OI se observa un incremento más suave que para E_2 y sin producirse cambios bruscos durante los estadíos estudiados y en el OD se observan ligeros movimientos ondulantes de poca trascendencia.

Tejido	Hormona	13d	15d	17d	19d	R.Nacido
OI	Pg	1.6	1.7	1.8	2.7	2.6
	E_2	14.7	4.1	3.8	4.7	6.8
OD	Pg	1.5	1.3	2.0	1.8	1.5
	E_2	6.9	3.4	1.4	1.7	1.5

Tabla IX: Grado de estimulación (Ge) en la producción de Pg y E_2 en ambos ovarios, en respuesta al agregado de LHo

OI: E_2anova no significativo; Pg anova significativo $p<<0.01$.

OD: E_2anova significativo $p<<0.01$, Pg anova significativo $p<<0.01$.

CONCLUSIONES GENERALES DEL CAPITULO

1. Tanto LH como FSH Hipofisarias aumentan desde el día 13 del desarrollo del embrión-hembra hasta el momento de la eclosión (fig.n°17).
2. Las concentraciones correspondientes a LH son siempre mayores que las correspondientes a FSH.
3. LH en suero muestra una curva que presenta dos máximos, en el día 15 y 19 del desarrollo. (fig. n°18).
4. No existen diferencias en la concentración sérica de LH entre los períodos de "verano" e "invierno" durante el desarrollo embrionario.
5. El día 19 es un "MAXIMO" de "ACTIVIDAD" para LH en suero en ambos períodos estacionales.
6. No existen diferencias importantes en la concentración endógena de progesterona del ovario izquierdo (funcionante) y derecho (rudimentario). (fig.n°19).
7. Ambos tejidos presentan en el día 19, un "máximo en la síntesis de progesterona", del orden de 4 a 8 veces mayor que las correspondientes a los otros estadíos.
8. La concentración de progesterona sérica es aproximadamente constante durante el período estudiado (fig.n°20).
9. La concentración de estradiol sérico aumenta desde el día 13 del desarrollo hasta el nacimiento.
10. El ovario izquierdo y el derecho responden a la estimu-

lación de LH "in vitro".(fig.n°21).

11. La respuesta del ovario derecho tanto para progesterona como para estradiol es escasa y disminuye a medida que progresa el desarrollo y la atrofia del mismo.

12. Sólo en el período más temprano e indiferenciado, se observa una síntesis elevada de estradiol en ambos ovarios.

13. En el ovario izquierdo la respuesta a LH se hace más evidente en las proximidades de la eclosión.

14. Existen semejanzas entre las curvas de concentración de LH y FSH hipofisarios y E_2 sérico. Todas aumentan contínuamente hacia las proximidades de la eclosión. (fig.n°17 y n° 20).

15. Día 19 del desarrollo, se observa máxima actividad de síntesis, secreción e importante estimulación. Es de hacer notar que este estadío es próximo a la eclosión. (fig.n° 17, 18, 19 y 20).

16. Estos eventos son coincidentes con eventos metabólicos y de comportamiento observados en la literatura (222).

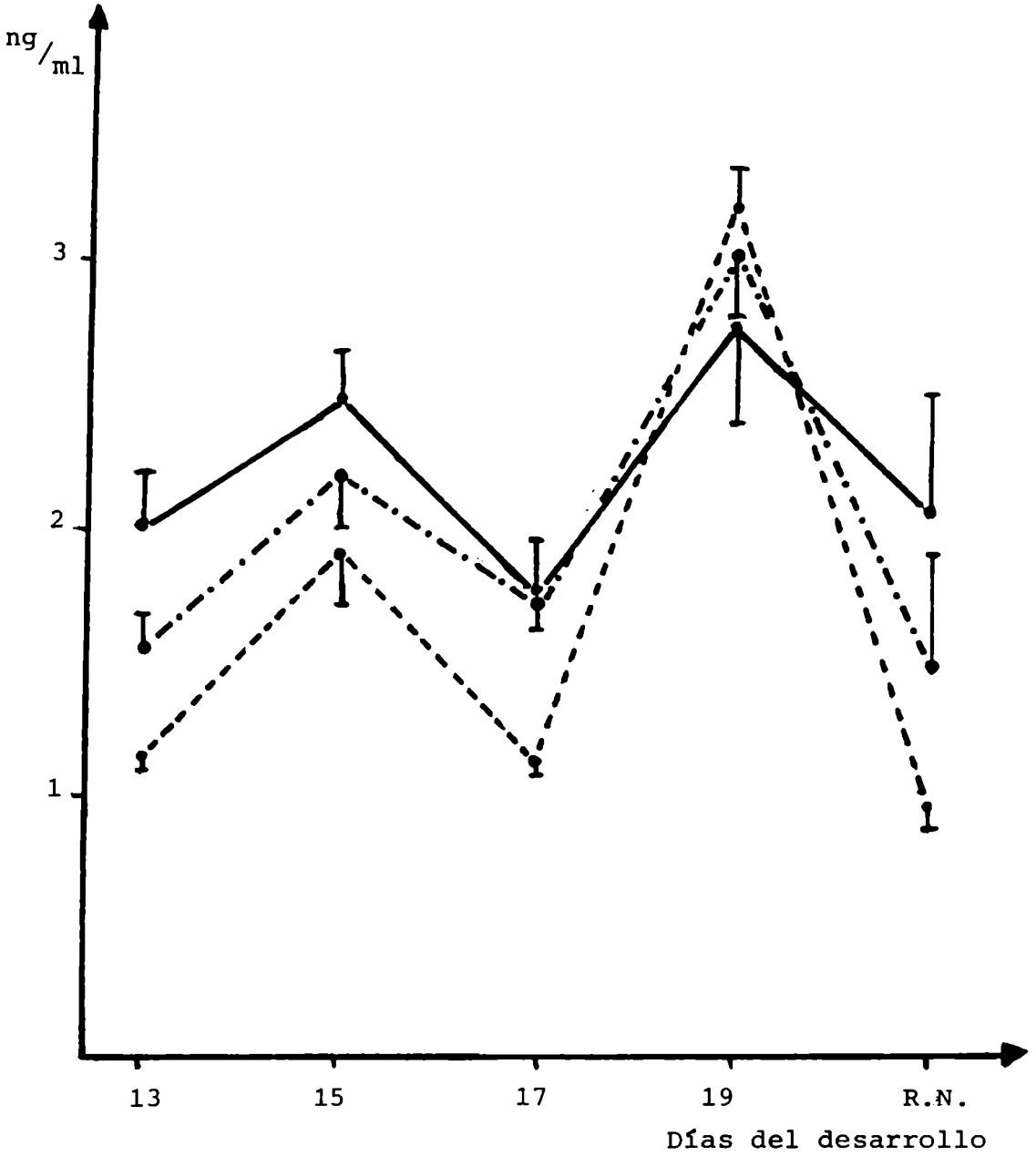

figura n°18: Concentración estacional de LH sérica, durante el período de "invierno" (---) , "verano" (——) , y promedio. (-·-·-)
En ng/ml. ± error standard.
RN=Recien nacido.

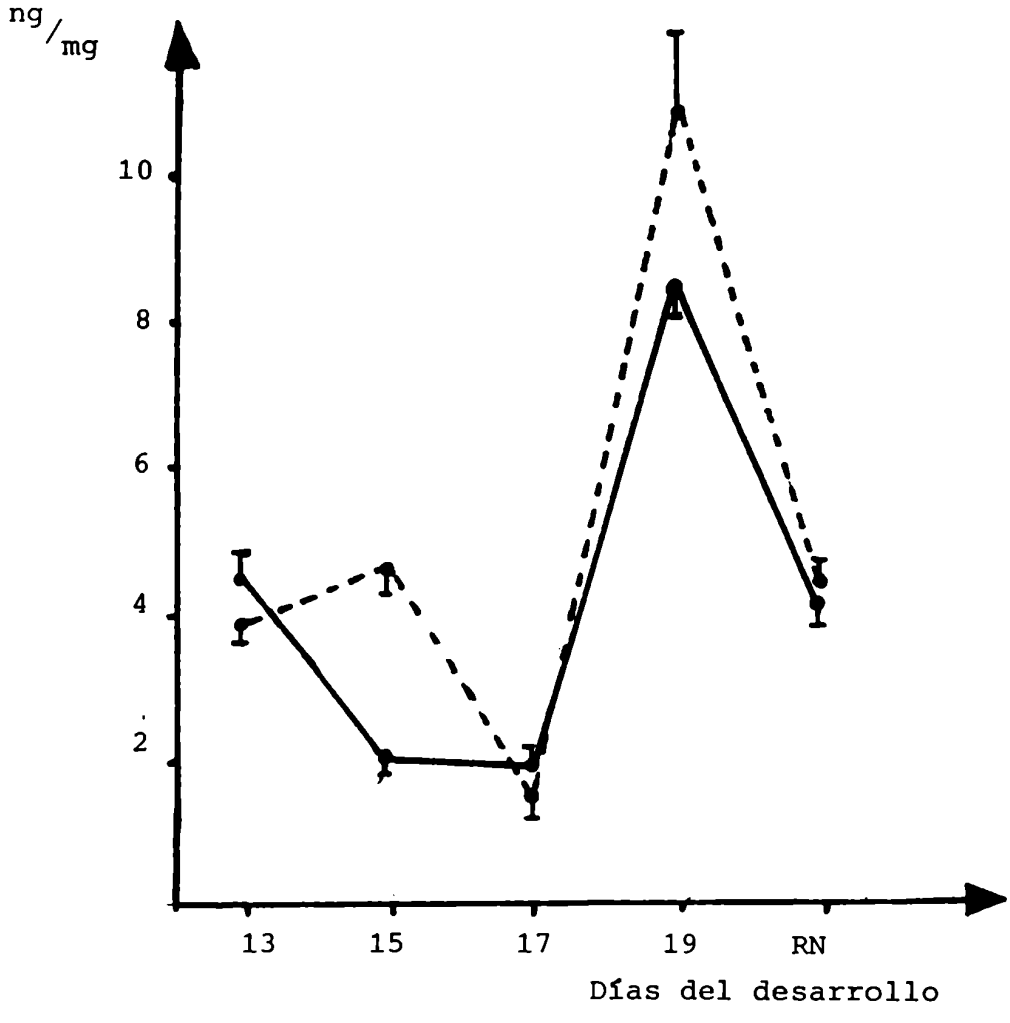

figura n°19: Contenido endógeno de progesterona en ovario izquierdo (——) y ovario derecho (---) durante el desarrollo embrionario. En ng/mg de tejido ± error standard.

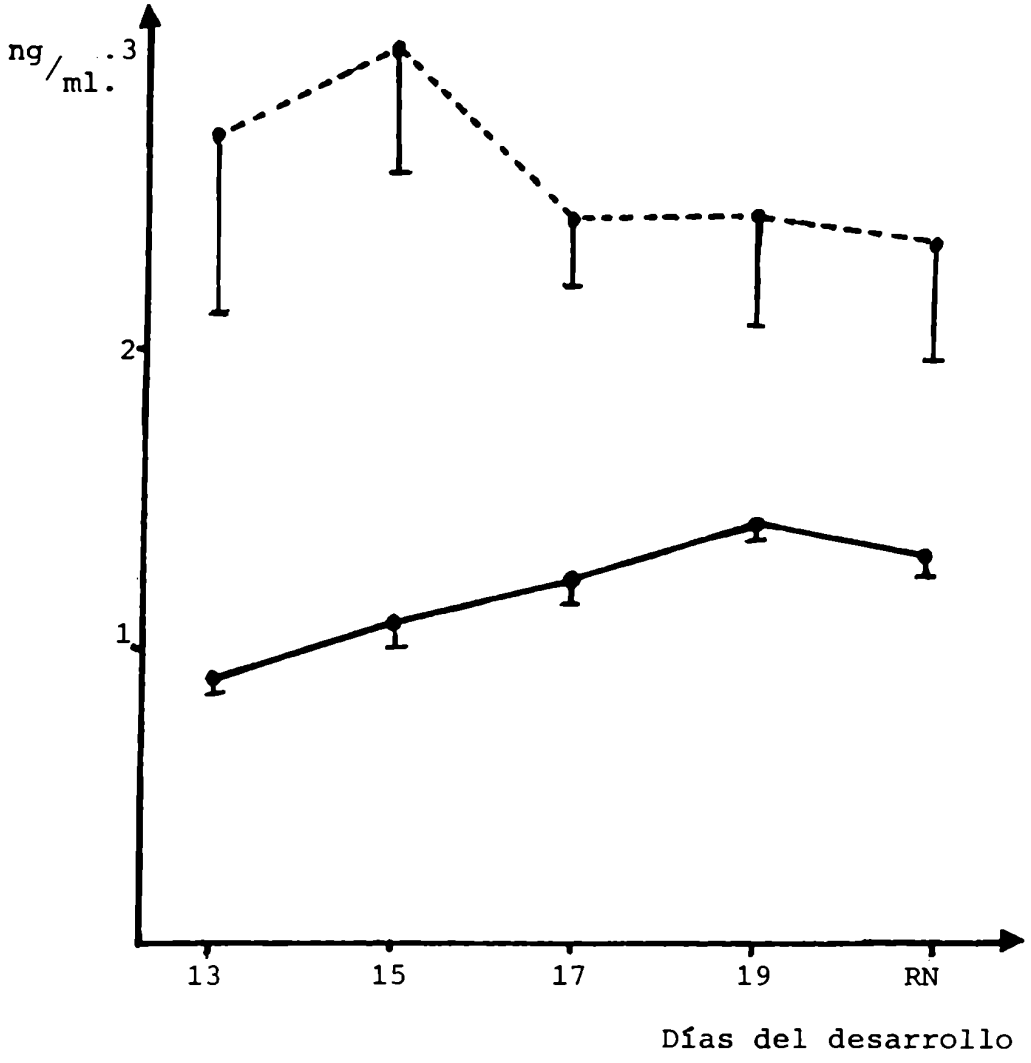

figura n°20: Concentración sérica de progesterona (---) y estradiol (——) durante el desarrollo embrionario.
En ng/ml ± error standard.

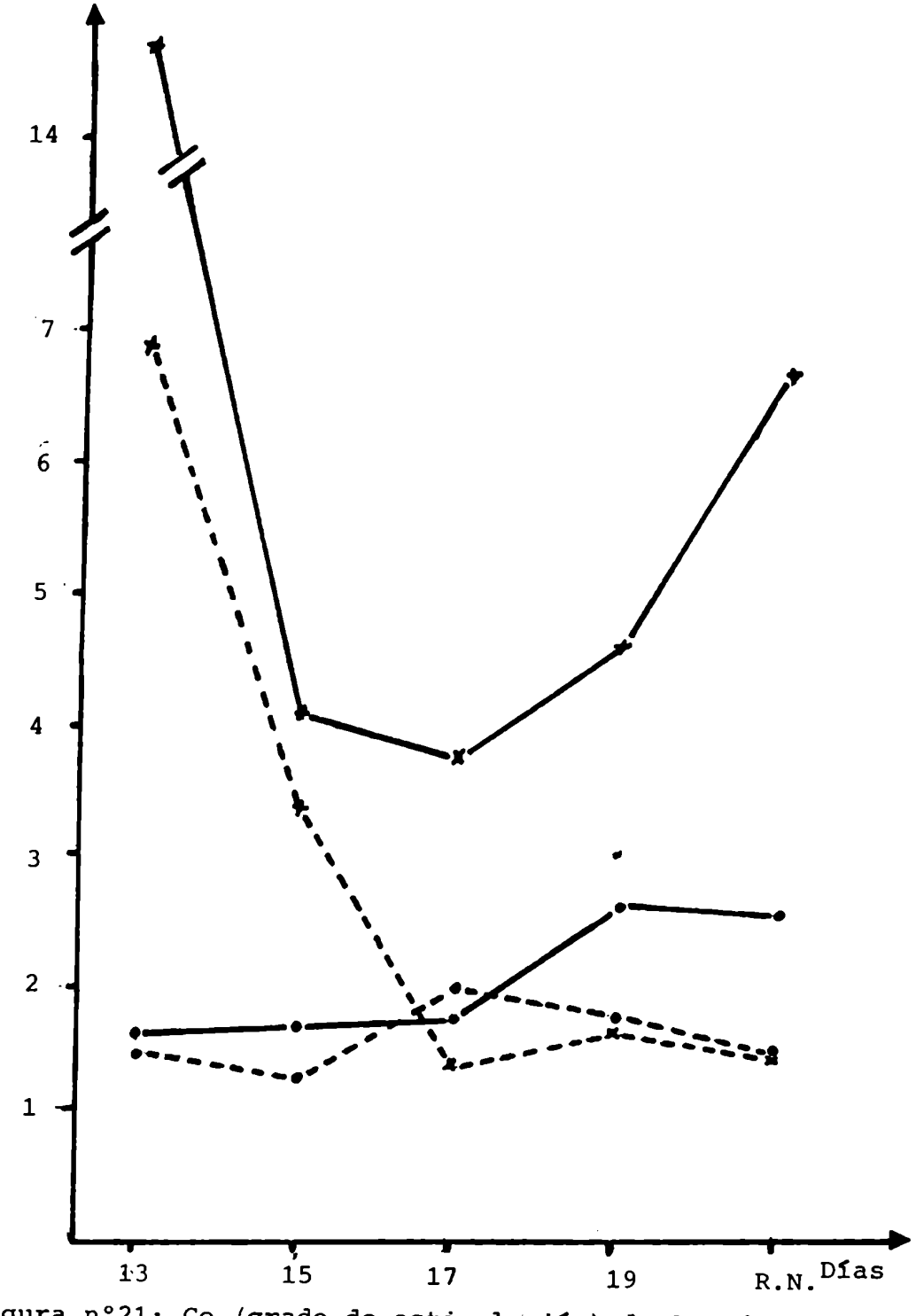

figura n°21: Ge (grado de estimulación) de la síntesis de progesterona(-•-) y estradiol(-x-)en el ovario izquierdo(—) y derecho (---) durante el desarrollo embrionario.

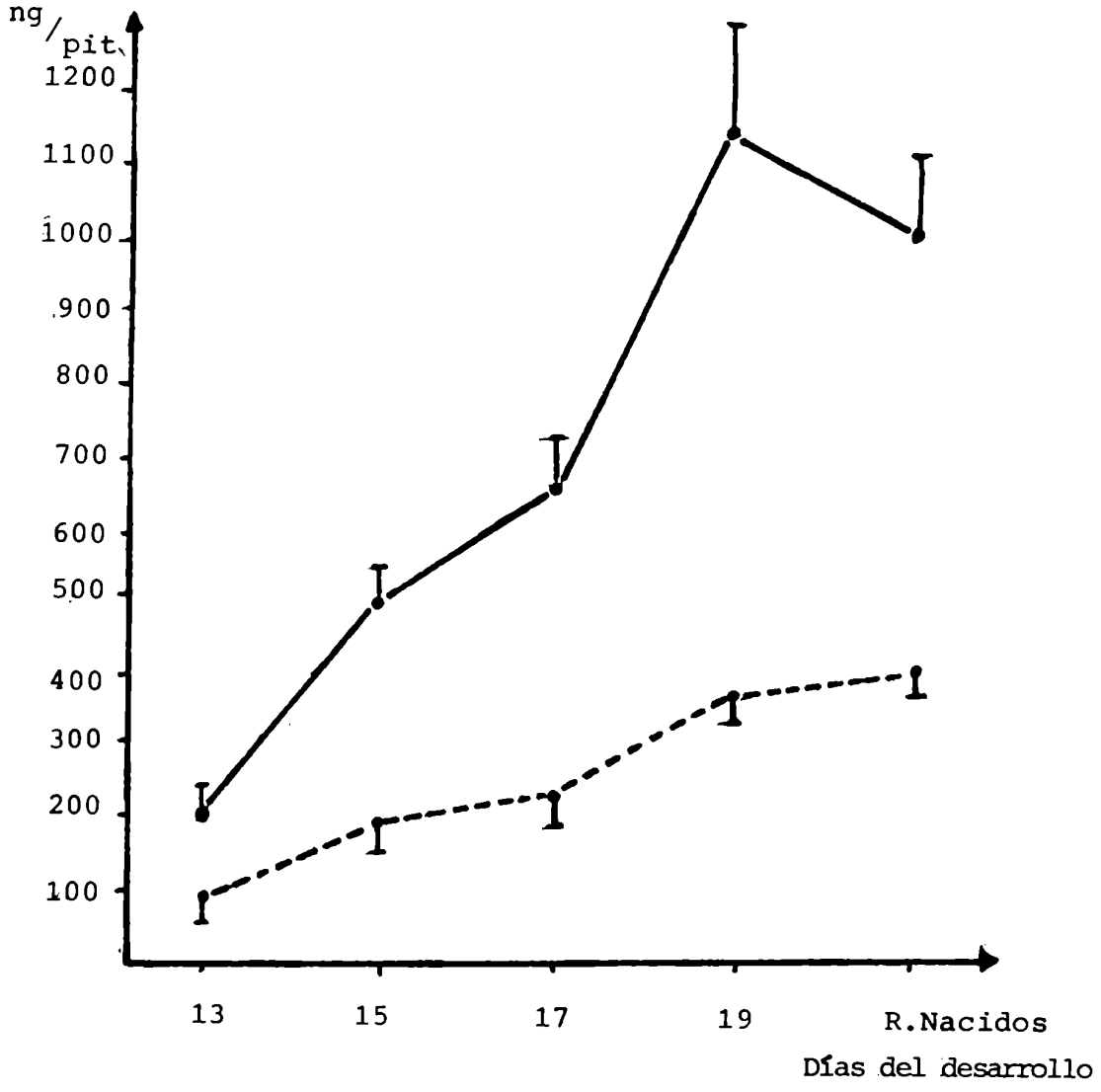

figura n°17: Concentración de LH (—) y FSH (---)en hipófisis de embrión de pollo hembra.

En ng/pituitaria ± error standard.

CAPITULO III

ESTEROIDOGENESIS EN ADRENAL Y RELACION ENTRE EL METABOLISMO REDUCTIVO DE LA PROGESTERONA Y LA SINTESIS DEL HEMO EN AMBOS TEJIDOS ESTEROIDOGENICOS DEL POLLO

ESTEROIDOGENESIS ADRENAL

Como ya se describiera la biosíntesis de esteroides ováricos en el capítulo II, se hará aquí un resumen del estado actual de la síntesis de esteroides en glándulas suprarrenal.

A modo general, considerando la esteroidogénesis en la glándula suprarrenal, podemos señalar que a través de estudios *in vitro* (91, 151, 92, 152, 153, 154, 155, 156) se logró determinar que:

- La adrenal de ave sintetiza 17 - deoxicorticosteroides; B, 18OH-B, Aldo y en menor proporción 11-deoxi-B, 18OH-11deoxi-B y cortisol.
- Los pasos metabólicos de la síntesis de estos esteroides siguen la clásica ruta, Acetato → Colesterol → Pregnenolona → Progesterona → DOC → B → 18OH-B → Aldo.

En presencia de precursores exógenos como Progestero

na-C^{14} y Pregnenolona-^{3}H, la glándula suprarrenal del embrión de pollo sintetiza B, Aldo, 18OH-B, DOC, 11βOH - Pregnenolona. De ambos precursores la Pg es la más eficaz; sus metabolitos producidos en mayor cantidad son B y 18OH-B (151).

Kalliecharan y Hall (157) estudiaron la síntesis de Progesterona a partir de Pregnenolona radiactiva durante el desarrollo embrionario, determinando la presencia de Pg en el estadío de nueve días, el perfil descripto por ellos muestra un máximo en el día 17 del desarrollo, que disminuye hacia el día 19 para recuperarse luego en el nacimiento.

Mediante técnicas de radioinmunoanálisis, se determinó la presencia de Pg, T y E_2 tanto en adrenal como en ambos ovarios del embrión de 17 y 20 días y en pollos jóvenes (101). Se encontró que la adrenal produce más T que el ovario. La cantidad de esteroides sintetizados disminuye en el orden Pg>T>E_2,donde Progesterona en este caso crece ininterrumpidamente hacia el nacimiento. En cambio en los ovarios se sintetiza T>E_2>Pg. Donde Progesterona disminuye al acercarse el nacimiento. Luego aumenta rápidamente a partir del 3° día de vida.(101).

METABOLISMO REDUCTIVO DE LA PROGESTERONA

Por otra parte son conocidos los estudios en algunos estadíos del embrión de pollo en las que se pone de manifies-

to la presencia de Progesterona como uno de los principales esteroides, cuando no el principal, sintetizando en ambas glándulas esteroidogénicas, adrenal y ovarios (157, 101, 158).

La importancia de esta hormona, no sólo radica en la actividad progestágena que desarrolla per sé, sino también en el hecho de ser el principal precursor de las hormonas esteroides típicas sintetizados por dichas glándulas, T,E_2 y corticoides. También es precursor de derivados reducidos cuya importancia se pone de manifiesto en este capítulo.

En él, describiremos nuestros trabajos sobre la presencia de Progesterona en ovarios y adrenal, su metabolismo a compuestos reducidos, y la influencia del metabolito 5β-reducido sobre la enzima δ-Ala-S, primera del camino metabólico del hemo y reguladora de un paso limitante de este.

Al igual de lo que sucede en mamíferos, también en el pollo los corticoides, productos principales del metabolismo de Pg en corteza suprarrenal tienen participación en la gluconeogénesis y glucogenogénesis hepática, en la lipogénesis, degradación de proteinas y control de sales del medio interno.

El hallazgo de metabolitos reducidos de la Progesterona en adrenal de mamífero en 1965 (159) y años más tarde en adrenal de embrión de pollo de 15 días (160, 161), así como la característica de esta última reducción, cuya orientación preponderante fue la A/B cis, lograron que desde un principio los autores especularan en un doble rol para la 5β-pregnanodiona:

el de un catabolito inactivo o el de un inductor específico de alguna proteina (161). Un poco más tarde los experimentos farmacológicos de otros autores sobre efectos de andrógenos y progestágenos 5β-reducidos sobre la δ-Ala-S en hígado (10, 162, 163, 164), parecerían dar sustento a la segunda hipótesis.

El estudio del metabolismo de Progesterona in vivo demostró la presencia de ciertos metabolitos reducidos con una vida media de 16-18 minutos en plasma, y aún 7 hs. después en excreta (165).

De estos metabolitos el 62% corresponde a esteróides libres, entre los que se encuentran en mayor cantidad dos dioles, 5β-pregnano 3α, 20β diol y 3αOH, 5β pregnano-20 ona, y un pregnantriol no identificado (166), y el 32% restante corresponde a conjugados del ácido sulfúrico (167).

Posiblemente se excreta también el metabolito 5α - pregnano, dado que se observó que se sintetiza en oviducto de pollo (168).

Además, estudios in vitro con ovario de rata inmadura e in vivo, demostraron la presencia de una alta actividad 5α-reductásica (169, 170, 171).

Esta última actividad también fue hallada en hipófisis e hipotálamo, con formación de metabolitos reducidos que actuarían directamente sobre estos tejidos (172, 173).

Zanisi y Martini (174), demostraron que la 5α-preg-

nanodiona ejerce un efecto feedback positivo sobre la secreción de LH y FSH en ratas castradas activadas con estrógenos, cuya magnitud es similar a la producida por la Progesterona misma.

En cuanto a la actividad 5β-reductásica sobre la que ya hemos hablado al comienzo del capítulo, más específicamente podríamos decir, que estudios de ciertos autores indican que un posible rol como inductor estaría ejercido a nivel del control de la síntesis del hemo (162, 164).

Esta regulación se ejercería a través de la primera enzima de su camino biosintético, la δ-Ala-Sintetasa.

Esta enzima se halla en la matriz mitocondrial, tiene un PM de 63000-65000 Da (175, 176), y es sintetizada inicialmente como un precursor de 75.000 Da (176), en los polisomas citoplasmáticos.

La velocidad de esta enzima es limitante y susceptible a la represión por hemo e inducción por drogas y metabolitos de esteroides.

BIOSINTESIS DEL HEMO

El camino biosintético del hemo se inicia con la condensación de la Glicina y de la Succinil-CoA para dar el ácido δaminolevúlico en mitocondria, etapa catalizada por la enzima δALA-S a la que hacíamos referencia en el párrafo anterior.

I) Succinil CoA + Glicina $\xrightarrow[\delta\text{-ALA-S}]{}$ δ-ALA + CO_2 (mitoc)

II) 2 δ-ALA $\xrightarrow[\text{Ala-Dehidrasa}]{}$ Porfobilinógeno (PBG) (citoplasma)

III) 4 PBG $\xrightarrow[\text{Uro'gen III cosintetasa}]{\text{Uro'gen I Sintetasa}}$ Uroporfirinógeno III (uro'gen III) (cit.)

IV) Uro'gen III $\xrightarrow[\text{Decarboxilasa}]{\text{Uro'gen}}$ Coproporfirinógeno III (Copro'gen III) (cit.)

V) Copro'gen III $\xrightarrow[\text{Coprogenasa}]{}$ Protoporfirinógeno IX (Proto'gen IX) (mitoc)

VI) Proto'gen IX $\xrightarrow[\text{oxidasa}]{\text{Proto'gen}}$ Protoporfirina IX (Proto IX) (mitoc.)

VII) Proto IX $\xrightarrow[Fe^{2+}]{\text{Ferroquelatasa}}$ Hemo (mitoc.)

La regulación de este camino está ejercida por su producto final Hemo, a nivel de la primera enzima, δALA-S. Esta regulación feedback evita la formación y acumulación de intermediarios, para facilitar la economía celular.

También, la actividad de la δALA-S parece estar regulada en forma específica según el tejido que se trate, por una serie de factores que incluyen, estados nutricionales (177 178), hormonas (179, 180), drogas porfirinogénicas (181, 182) e iones metálicos (183, 184).

Esta actividad ha sido estudiada en hígado humano adulto (181), en tejidos extrahepáticos como bazo, riñón, corazón, sistema músculo esquelético, y en tejidos esteroidogénicos como testículo y glándula adrenal (177, 185, 186, 187, 188

178, 189).

Poseyendo el Citocromo P_{450} un núcleo prostético de naturaleza héminica es particularmente relevante relacionar todo lo concerniente a la δALA-S en este Citocromo.

Aquellos tejidos metabolizantes de drogas, como hígado o riñón, con un alto nivel de Citocromo P_{450}, y los tejidos esteroidogénicos, que poseen distintos Citocromo P_{450} involucrados en una serie de hidroxilaciones parecen contener una mayor actividad de δALA-S que los otros examinados.

Se ha demostrado la influencia que ciertos metabolitos A/B cis reducidos de andrógenos y Pg ejercen sobre la actividad δALA-S en un gran número de células, órganos, especies y estadíos del desarrollo, que va desde el blastodermo de pollo hasta médula ósea humana adulta.

Sin embargo en estos experimentos se utilizaron dosis formacológicas de estos metabolitos. En cultivo de médula ósea humana se estimuló el crecimiento de precursores de eritrocitos tempranos y tardíos, por medio de los 5β-esteroides. (163).

Irving y col. (162), utilizaron cultivo de blastodermo de pollo para observar la acción de los 5β androstanos sobre la síntesis de hemoglobina. Eligieron este sistema, dado que les permitía hacer un estudio de la eritropoyesis, sin el uso de artefactos; y por otro lado la elección de ese metabolito se debió a la estructura angular del mismo, producto de la

orientación cis de los anillos A y B.

De este modo, podrían determinar la existencia de mecanismos de unión de alta afinidad o sistemas "receptores" específicos para estos esteroides en la regulación de la eritropoyesis. Además en una comunicación anterior ya habían comentado la probable existencia de un sistema receptor para los 5β reducidos en blastodermo de pollo (190). Aunando estas experiencias, llegaron a la conclusión de que la estimulación eritropoyética requiere de la presencia del caracter angular del esteroide 5βreducido.

Trabajando con cultivo de médula ósea humana, Mizoguchi y Levere (191), estimularon la síntesis del hemo y de la globina con esteroides C_{19} y C_{21} de configuración 5β, derivados de la biotransformación de T y Pg en el hombre; encontraron que esta acción era independiente de la eritropoyetina, y dado que estos compuestos eran efectivos a bajas concentraciones, sugirieron la posibilidad de que los mismos tuvieran un papel fisiológico en la eritropoyesis humana.

Urabe y col. (163) confirmaron los resultados anteriores en el mismo sistema y demostraron la mayor capacidad estimulatoria de los compuestos 5βreducidos respecto de sus epímeros 5α.

Estudios <u>in vitro</u>, con hígado de embrión de pollo de 18 días (175), establecieron la existencia de una estrecha relación entre la estimulación de δAla-S y el citocromo P_{450}, in

ducida por compuestos tales como Pg, 5βP, etiocolanolona y androstan-5,16 dien, 3βol.

Además se observó que la administración de un inhibidor de la Ferroquelatasa acentúa la activación de la δAla-S pero reduce la del Cit. P_{450}. Esto sugiere que la inducción del Cit. P_{450} en embrión de pollo depende de la síntesis de su propio hemo, o sea que se trata de un proceso asociado.

Los mecanismos de regulación de estos importantes eventos bioquímicos, fueron descriptos como mecanismos de switch o amplificación por King y Mainwairing en 1973 (200).

Los estudios de actividad y regulación de esta enzima δ-Ala-S han sufrido las limitaciones propias de la imperfecta sensibilidad de los métodos disponibles.

En la actualidad, grupos de trabajo están estudiando la purificación de esta enzima de mitocondria de embrión de pollo, lo que nos permitirá un manejo más eficaz de la misma(201, 202, 175).

Por otra parte, se observó en testículo que la administración de hCG resulta en un aumento de los niveles de Citocromo P_{450} mitocondrial y microsomal (192, 193).

En este mismo tejido, Tofilon y Piper (185) demostraron que las gonadotrofinas aumentan la δ-Ala-S, pero se desconoce el mecanismo concreto que las regula.

Los estudios relacionados con la enzima δ-Ala-S tienen particular relevancia, dado que se han encontrado variacio

nes de dicha actividad enzimática en las porfirias hepáticas hereditarias (194, 195, 196, 197).

Durante el período postpuberal, cuando la producción endógena de esteroides aumenta, se produce en la mayoría de los pacientes con porfirias hepáticas una acumulación de intermediarios del camino metabólico del Hemo, las porfirinas, y una reducción en el contenido o actividad del citocromo P_{450} hepático (198).

La Progesterona y su metabolito 5β-reducido, son producidos en mayor cantidad en la fase luteal del ciclo menstrual y como potentes inductores, en el humano, de δ-Ala-S y citocromo P_{450} pueden ser responsables de ciertos desordenes relacionados con los observados en los pacientes (199).

Por todo ello, los estudios en embrión de pollo como modelo dan bases para comprender la influencia que los esteroides endógenos pueden jugar en la exacerbación de porfirias hereditarias hepáticas postpuberales.

Y estos estudios deberían alcanzar todas las relaciones posibles entre los componentes del eje neuroendócrino-hemático propuesto y sus posibles vinculaciones con la patología de referencia.

Enumerados los antecedentes de que disponemos acerca de este problema endócrino experimental y algunas de sus posibles aplicaciones, se le plantean al investigador una serie de interrogantes que no sólo abarcan el mero hecho de comple-

tar la información disponible acerca de valores y relaciones hormonales y enzimáticas sino que estimulan el afán por conocer las probables derivaciones prácticas, en este caso genéticas, clínicas, terapeúticas y pronósticas, que pueden tener la producción, la actividad y las regulaciones recíprocas de los esteroides y las enzimas que comentamos.

Analizándo aquí también las necesidades que se desprenden de los antecedentes enumerados, podemos decir respecto de la existencia y valoración de los compuestos 5α y 5βreducidos de la Pg en ovarios y adrenal de embrión, que los datos existentes son escasos en lo que respecta a 5β-P y prácticamente nulos para 5α-P, lo que impide aseverar acerca de la actividad reductásica en ambos tejidos esteroidogénicos atribuibles a esos compuestos, durante el desarrollo embrionario.

Otro interrogante a considerar, del que no se disponen datos, es la probable influencia hipofisaria directa, ya sea via el ACTH o las gonadotrofinas o ambas hormonas, sobre la producción de metabolitos reducidos de Pg.

En cuanto a la determinación de la actividad de la enzima δAla-S en ambos tejidos esteroidogénicos, existen datos aislados para algunos estadíos del desarrollo; su inducción por metabolitos de esteroides, reducidos en 5β, se comprobó mediante el agregado de grandes cantidades de 5β exógeno (162, 182).

Es por ello que en este trabajo, se completa la determinación de esta enzima durante el desarrollo embrionario

y se comprueba la inducción por 5β-preganonodiona exógenos, en presencia de inhibidores de la síntesis de Pg, a nivel de la Δ 5,3βHidroxiesteroide Dehidrogenasa y de la 17αHidroxilasa, cianocetona(CNK) y espirolactona (SPNL) respectivamente.

En este capítulo los experimentos propios consistieron en:

1. Determinación de los niveles de Pg en adrenal de embrión de pollo hembra en los estadíos de 13, 15, 17, 19 días y en recién nacidos.

2. Evalución de los niveles de transformación de Pg a los metabolitos 5α y 5β pregnanodiona, en ovarios,adrenal e hígado de embrión de pollo hembra en los estadíos citados en 1.

3. Determinación de niveles de actividad de la enzima δAla-S en ovarios, adrenal e hígado de embrión de pollo hembra, en los estadíos citados en 1.

4. Demostración de la inducción de la enzima δAla-S, por el agregado de 5βpregnanodiona (5βP) exógeno en presencia o ausencia de inhibidores de la síntesis de Pg y por ende de 5β-pregnanodiona a nivel de las enzimas Δ5,3βHidroxiesteroide Dehidrogenasa (Cianocetona) y 17αHidroxilasa (espironolactona) en adrenal de embrión de pollo hembra de 17 días.

Este listado de objetivos de ninguna manera agota la cuestión, dado que quedan aún varios aspectos a considerar en futuras investigaciones.

PUNTO I

CONTENIDO DE PROGESTERONA EN ADRENAL

1. MATERIAL Y METODOS

1.1. Extracción y Preparación de Muestras

Se utilizaron embriones de pollo híbrido doble pechuga, genética Copp de 13, 15, 17, y 19 días del desarrollo embrionario.

Los huevos se mantuvieron en un incubador marca Alonso S.R.L. modelo n°75, a 37°C y en atmósfera humificada hasta el estadío del desarrollo adecuado a cada experimento.

Los animales fueron sacrificados por decapitación y se mantuvieron sobre hielo durante el período intraoperatorio. Se disecaron las adrenales, se colocaron en pools, pesaron y homogenizaron con 2,5 ml. de una solución etanol-agua (20:80) (v/v) con potter teflón-vidrio,

Se les agregó a cada muestra Pg-^{14}C como tracer (Ae: 57.2 mCi/mmol) y finalmente el homogenato fue extraído 4 veces con 6 ml. de Cloruro de Metileno cada vez.

El extracto se evaporó bajo atmósfera de N_2, se redisolvió en 3 ml. de Metanol y se conservó durante toda la noche en heladera (4°C) para el desgrase.

Transcurridas doce horas aproximadamente, las muestras se filtraron a través de vidrio frito. El filtrado se evaporó bajo N_2 hasta la sequedad y en esas condiciones se conservó en heladera hasta su utilización.

Haremos una breve descripción de la ubicación anatómica de las glándulas suprarrenales utilizadas en este experimento.

Las adrenales están situadas delante de los riñones, sobre su cara interna e inmediatamente antes de la bifurcación de la vena cava, posterior. Para su extracción fue necesario hacer un corte sagital en el cuerpo del animal y separar hígado, vesícula, estómago e intestino, dejando así claro el campo operatorio. (fig. n°22).

1.2. Determinación del Contenido Endógeno de Pg

La descripción del método utilizado en este ensayo se halla contenida en el Capítulo II, punto III, 1.2, en este punto sólo enunciaremos los títulos que se detallaron en la referencia citada.

1.2.1. Aparato

1.2.2. Fase Móvil

1.2.3. Esteroides

1.2.4. Velocidad de Flujo

1.2.5. Velocidad de Carta

1.2.6. Determinación del Lag de Colección

1.2.7. Procedimiento

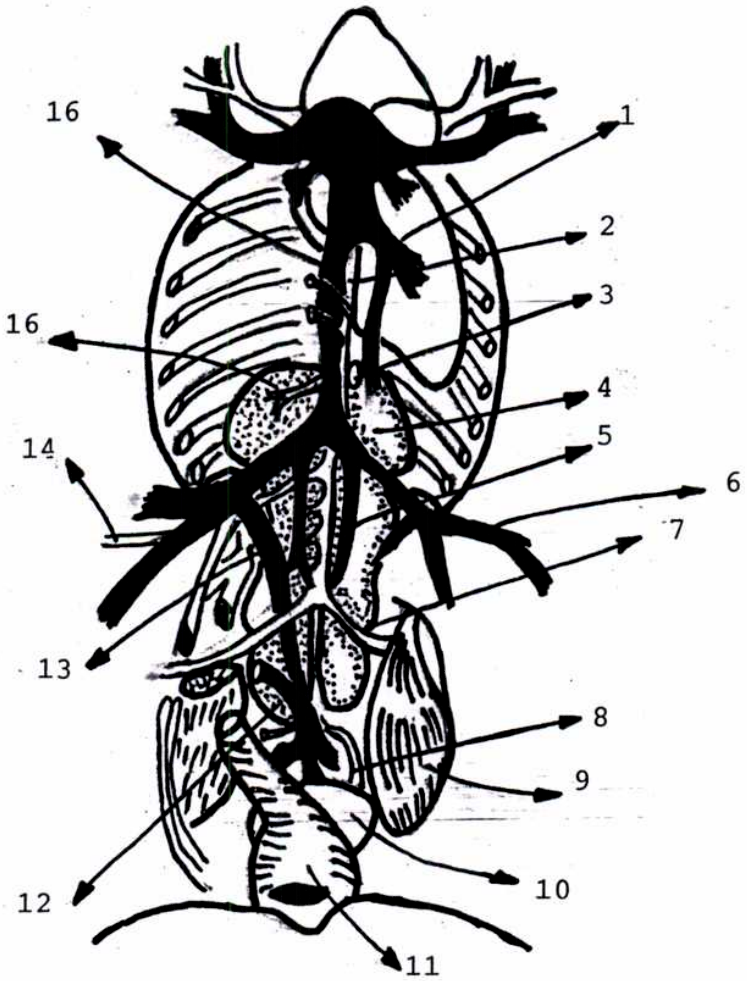

figura n°22: VISTA ANTERIOR DEL ABDOMEN DEL EMBRION (Ubicación de la glándula adrenal).

1.Vena hepática - 2. Aorta dorsal - 3. glándula adrenal - 4. lóbulo renal anterior - 5. vena renal - 6. vena femoral - 7. arteria ciática - 8. arteria ilíaca interna - 9. músculo obturador interno - 10.bolsa de fabricio -11.cloaca - 12. vena coxigromesenterica - 13. vena porta renal - 14.arteria femoral - 15. arteria renal - 16. vena cava posterior.

1.2.8. Curvas de Calibración. Sensibilidad

2. RESULTADOS

2.1. Metodológicos

Son válidos los mismos comentarios realizados en el mismo punto en el capítulo II, ya que allí se discuten resultados respecto del método y su aplicación.

2.2. Bioquímicos

Los resultados correspondientes a ovario izquierdo y derecho se incluyeron en el punto 2.2 del capítulo II, y los correspondientes a adrenal se enumeran en tabla X.

Los métodos estadísticos empleados fueron anova de un factor utilizando el test de homogeneidad de Bartlett. Los contrastes a posteriori, se realizaron para una población heterogenea de acuerdo a Tukey-Kramer o Scheffé (135, 136).

Tejido	13 días	15 días	17 días	19 días	R. Nacidos
Adrenal	2.52±0.15	1.26±0.14	1.44±0.15	1.96±0.14	3.42±0.17

Tabla X: Concentración de Pg (ng/mg tejido) en adrenal de embrión de pollo. Los valores promedio corresponden a determinaciones por triplicado de dos muestras procesadas en distintos días. Anova significativa $p<<0.001$.

La concentración de Pg en este tejido es alta en el

estadío de 13 días, desciende luego hacia el día 15 y se recupera en las proximidades del nacimiento.

No se observan máximos, la función tiende a aumentar con el desarrollo embrionario.

PUNTO II

METABOLISMO DE LA PROGESTERONA EN TEJIDOS ESTEROIDOGENICOS E HIGADO

1. MATERIAL Y METODOS

1.1. Extracción y Preparación de Muestras

Se utilizaron 1000 embriones de pollo hembra, híbrido doble pechuga, genética Copp, de 13, 15, 17 y 19 días del desarrollo y pollos recién nacidos.

Los huevos se mantuvieron en incubadora a 37 - 38°C, marca Alonso S.R.L., Modelo 75, con ambiente humidificado hasta los distintos estadíos del desarrollo embrionario.

Los animales fueron sacrificados por decapitación, separados por sexo y mantenidos sobre hielo durante el proceso intraoperatorio.

Se disecaron los ovarios, la adrenal y el hígado, se pesaron y colocaron en pools y se incubaron como se detalla más adelante.

1.2. Métodos Utilizados

1.2.1. Sistemas Cromatográficos en Papel

a) TPG: Tolueno-Propilenglicol (3:1) (144).

Se realizó cromatografía descendente en papel Whatman n°1.

Se utilizaron cortinas de 5 a 6 tiras de 2 cm. de ancho por 45 cm. de largo.

Estas cortinas se embebieron previamente en una mezcla de propilenglicol-metanol (1:2), contenida en navecillas.

Una vez eliminado el exceso de la solución por evaporación se sembraron las muestras a analizar, colorantes y patrones necesarios. La siembra se realizó en punto en todos los casos.

Luego se colocaron las cortinas en las cubas cromatográficas dejándolas estabilizar por una hora, al cabo de la cual se desarrolló el cromatograma con el agregado de solvente de corrida, Tolueno-Propilenglicol (3:1), por espacio de 15-16 hs., hasta obtener una abundante overflow.

Pasado ese tiempo se retira la cortina de la cuba, se seca y se somete a análisis.

b) Bush A: Heptano-Metanol-Agua (5:4:1) (145).

Las cortinas utilizadas fueron idénticas a las del TPG.

La siembra se realizó en punto directamente sobre las cortinas, sin embeberlas en ningún solvente.

Se sembraron las muestras, patrones correspondientes y colorantes Azul Nilo Y Sudan III.

Las cortinas se estabilizaron en la cuba cromatográ-

fica durante 1 hora y se desarrolló el cromatograma por espacio de 4 hs.

Al término de las cuales, se retiran las cortinas, se secan y se procede al análisis de esteroides.

b) Bush B_5 : Benceno-Metanol-Agua, 1:0.5:0,5 (145).

El método empleado es el mismo descripto para el sistema Bush A (b).

El tiempo de corrida de la cromatografía fue de aproximadamente 9-10 hs.

c) Cydi I: Ciclohexano-Dioxano-Metanol-Agua.
4;4:2:1 (203).

El método empleado es el mismo descripto para el sistema Bush A (b).

El cromatograma se desarrolló durante aproximadamente 7-8 hs.

d) CyBz: Cyclohexano-Benceno-Metanol-Agua.
4:3:4:1 (203).

El método empleado es el descripto para el sistema Bush A (b).

El cromatograma se desarrolló durante aproximadamente 8 hs.

1.2.2. Sistema Cromatográfico en Placa Delgada

El solvente de corrida utilizado fue Heptano-Acetato de Etilo (3:1) (159).

Se utilizaron placas de vidrio de 20 cm x 20 cm.x 0.5

cm. de espesor.

El lecho cromatográfico se componía de una solución de Sílica Gel G-agua destilada en relación 1:2.

Las placas se activaron durante una hora a 110°C.

La siembra se realizó directamente, muestra a analizar y patrones respectivos, la cantidad utilizada de estos últimos fue de 25 µg.

Se desarrolló el cromatograma a T ambiente con el solvente arriba mencionado durante aproximadamente 2 hs.

Al término de las cuales se retiran las placas, se secan y analizan los esteroides.

1.2.3. Caracterización de los esteroides

a) Preparación de los Acetatos (203)

Los acetatos de Corticosterona y Aldosterona, se obtuvieron por tratamiento con Anhidrido Acético y Piridina, los productos de reacción se separaron y caracterizaron por sus Rf en cromatografía en papel en el sistema Cydi I.

Cortisol y Doc (Deoxicorticosterona) se acetilaron por el mismo procedimiento, y sus Acetatos se cromatografiaron en TPG y Bush A respectivamente.

b) Obtención de "L" 18OH-B y "L" 18OH-DOC a partir de "M" (204).

En este caso el eluído de la zona correspondiente al "M"-esteroide, se mantuvo en metanol durante una semana a fin de obtener una forma menos polar del compuesto, es decir la for

ma "L".

Luego se evaporó el metanol bajo N_2 y se sembró el residuo seco en presencia de un standard y se cromatografió en los sistemas Bush B_5 para "L" 18OH-B y TPG para "L" 18OH-DOC.

c) Saponificación de Acetatos (205)

El estroide C_{21}-acetoxi se disolvió en un pequeño volumen de bicarbonato de potasio (metanol) al 0.4% (p/v).

La solución se saturó con N_2 y se dejó durante 8 hs. a temperatura ambiente en cuarto oscuro.

Los esteroides libres se extrajeron con solución de acetato de etilo y el extracto se lavó con agua y se filtró a través de sulfato de sodio anhidro y luego se evaporó y cromatografió.

Esta técnica fue utilizada para los Acetatos de B.

d) Oxidación de los Acetatos (203)

Los diacetatos de Aldosterona fueron tratados con CrO_3 al 0.5% en acético glacial durante 10 minutos a temperatura ambiente, se detuvo la reacción por el agregado de etanol al 20%.

Esta técnica según Kliman y Peterson (203), produce la 11,18 Lactona del 21 Monoacetato de Aldosterona (Lama) para el diacetato de Aldosterona. El derivado se purificó en el sistema Cy-Bz.

1.2.4. Detección de los Esteroides en los Cromatogramas

a) Los esteroides radionertes que absorben a 240nm (Δ4,3 ceto), se detectaron en los cromatogramas en papel, uti-

lizando la emisión principal a 253.7 nm (onda corta) de una lámpara U.V.(Mineralight t Short Wave U.V., S11).

En estos casos el papel fluoresce con una emisión violácea de intensidad variables, dependiente del solvente de corrida utilizado en la cromatografía, y la mancha más oscura que identifica la posición del esteroide por contraste, es debida a la absorción de la radiación por excitación.

b) Los esteroides radiactivos sobre los cromatogramas en placa delgada, fueron detectadas al determinar la posición que ocupan los patrones respectivos, por exposición de la placa a vapores de I_2 bisublimado durante 5 minutos y demarcación de la zona coloreada por punteado.

El revelado de los mismos se produce por absorción del yodo sobre la superficie del esteroide.

c) Los esteroides radiactivos presentes en los cromatogramas en papel, fueron ubicados mediante el uso de un radiocromatógrafo Scanner, marca Packard, modelo 7201.

1.2.5. Elución de los Compuestos

Se empleó para ello el método discontinuo.

Las zonas del cromatograma en papel que contenía las muestras fueron cortadas en cuadraditos pequeños y colocadas en erlenmeyers de 50 ml.

Se utilizó como solvente de elución metanol.

Los erlenmeyers se ubicaron en un agitador mecánico y al cabo de 15 minutos de agitación, se extrajo el solvente

de elución con ayuda de una pipeta capilar (para evitar el arrastre de partículas de papel) y se volcó en tubos graduados.

Luego de ese paso se les agregó nuevamente el solvente de elución, procedimiento que se repitió tres veces.

Sobre alícuotas del 2% se realizaron las mediciones de radiactividad en un contador de centelleo líquido.

Los eluídos fueron concentrados bajo Nitrógeno en baño termostatizado a 37°C.

1.2.6. Medición de la Radiactividad

La medición de la actividad de las muestras que contenían ^{3}H y ^{14}C o mezcla de ambos, se realizó en un espectrómetro β de centelleo líquido, marca Marck III, modelo 6882(Trakor Analytic).

Las muestras a medir se colocaron en viales de vidrio de bajo contenido en K+ y se llevaron a sequedad bajo aire. Se les agregó 10 ml. de la solución centelladora (4 gs de PPO + 0.25 gs de Dimetil POPOP en 1 lt. de Tolueno),a cada vial (206, 207, 208).

Los viales previamente tapados y agitados, se dejaron durante 10 minutos, antes de su lectura en el contador, en oscuridad y a baja temperatura con el objeto de disminuir el fondo.

El procedimiento de medición requirió la determinación de los parámetros óptimos para ^{3}H y ^{14}C.

1.2.7. Método in vitro de la Reducción Enzimática de la Pro-

gesterona. Separación de las Fracciones

1.2.7.1. Procedimiento de Incubación

La glándula adrenal, los ovarios y el hígado se incubaron en 2 ml. de buffer Krebs-Ringer-Bicarbonato-Glucosa(≠) pH 7,4, en presencia del precursor radiactivo 1,2 ^{3}H-Progesterona a 37°C durante 30 minutos, bajo atmósfera de carbógeno (95% O_2 + 5% CO_2), en incubador metabólico tipo Dubnoff con agitación constante de 50 ciclos/seg.

El peso promedio de los pools utilizados fue:

Hígado	= 249,5±22,6 mg.	Ovario Izquierdo	= 34,4±3,8 mg.
Adrenal	= 45,7± 4,0 mg.	Ovario Derecho	= 23,8±2,7 mg.

Se detuvo la incubación por volcado del sobrenadante, en tubos cónicos conteniendo 4 ml. de Cloruro de Metileno, se realizaron dos extracciones más de 3 ml. c/u con el mismo solvente (209, 210).

(≠) Krebs-Ringer-Bicarbonato-Glucosa

1,63 ml.
- 100 ml. Cloruro de Sodio 0.9%.
- 4 ml. Cloruro de Potasio 1.15%.
- 1 ml. de Fosfato diácido de Potasio 2.11%
- 1 ml. de Sulfato de Magnesio Heptahidratado 3.82%

0.16 ml. Solución de 78,33 mg.de Dextrosa en 3,15 ml.de Bicarbonato de Sodio 1,29%.

0.05 ml. Cloruro de Calcio 1,22%.

El precursor utilizado es 1,2 ^{3}H-Progesterona, de la que se agregaron 4 pmoles, y cuya actividad específica es 50 Ci/mmol.

1.2.7.2. Secuencia Metodológica

Una vez realizada la incubación y previo a la extracción de los esteroides, se les agregaron los tracers Pg-^{14}C, Aldo-^{14}C y B-^{14}C.

Aquellos extractos cuyos homogenatos se realizaron con el hígado o alguno de los ovarios, luego de llevarlos a sequedad bajo Nitrógeno, se cromatografiaron en presencia de patrones y colorantes correspondientes en el sistema Bush A (1.2. 1 b). Este método nos permite separar Pg y ambos metabolitos 5α y 5β -P, del resto de los esteroides sintetizados por esos tejidos.

Para purificarlos aún más y separarlos entre sí, se los cromatografió en placa delgada en el sistema Heptano-Acetato de Etilo, 3:1 (1.2.2).

El revelado de los esteroides, indicó la presencia de Pg, 5α-pregnanodiona y 5β-pregnanodiona con distintos Rf.

La zona correspondientes a los esteroides, se tomó de la placa mediante el raspado de la sílica, lo que se volcó en viales y previo el agregado el líquido centellante, se midió la actividad en un contador de centelleo líquido según lo detallado en 1.2.6.

En cambio los extractos provenientes de la adrenal del

pollo previo a la realización de los pasos supraindicados, se los cromatografió primero en el sistema TPG (1.2.1.a) durante el tiempo necesario para obtener un abundante"overflow".

El "overflow" así obtenido se llevó a sequedad y entonces recien fue sembrado en el sistema Bush A(1.2.1 b) y se continuó con el procedimiento de aislamiento y purificación.

Los pasos utilizados en este punto se esquematizan en la figura n°23.

1.2.7.3. Caracterización de 5α y 5β Pregnanodiona

Luego de la separación y aislamiento de ambos metabolitos por placa delgada, como se describió oportunamente,se cristalizaron ambos en presencia de un carrier radionerte hasta actividad específica constante.

Se utilizó como solvente de cristalización eter etílico-heptano para 5β pregnanodiona y cloruro de metileno-acetona-agua para su isómero. 5α(Ver Resultados).

Este método permitió caracterizar los esteroides y asegurarnos que el material radiactivo aislado de la placa era el correspondiente a las dionas puras.

Es necesario destacar la buena reproductibilidad de los métodos de conteo de la radiactividad, gracias a que el quenching es corregido individualmente para cada muestra por una ventana automatizada para óptima energía dirigido por un analizador multicanal.

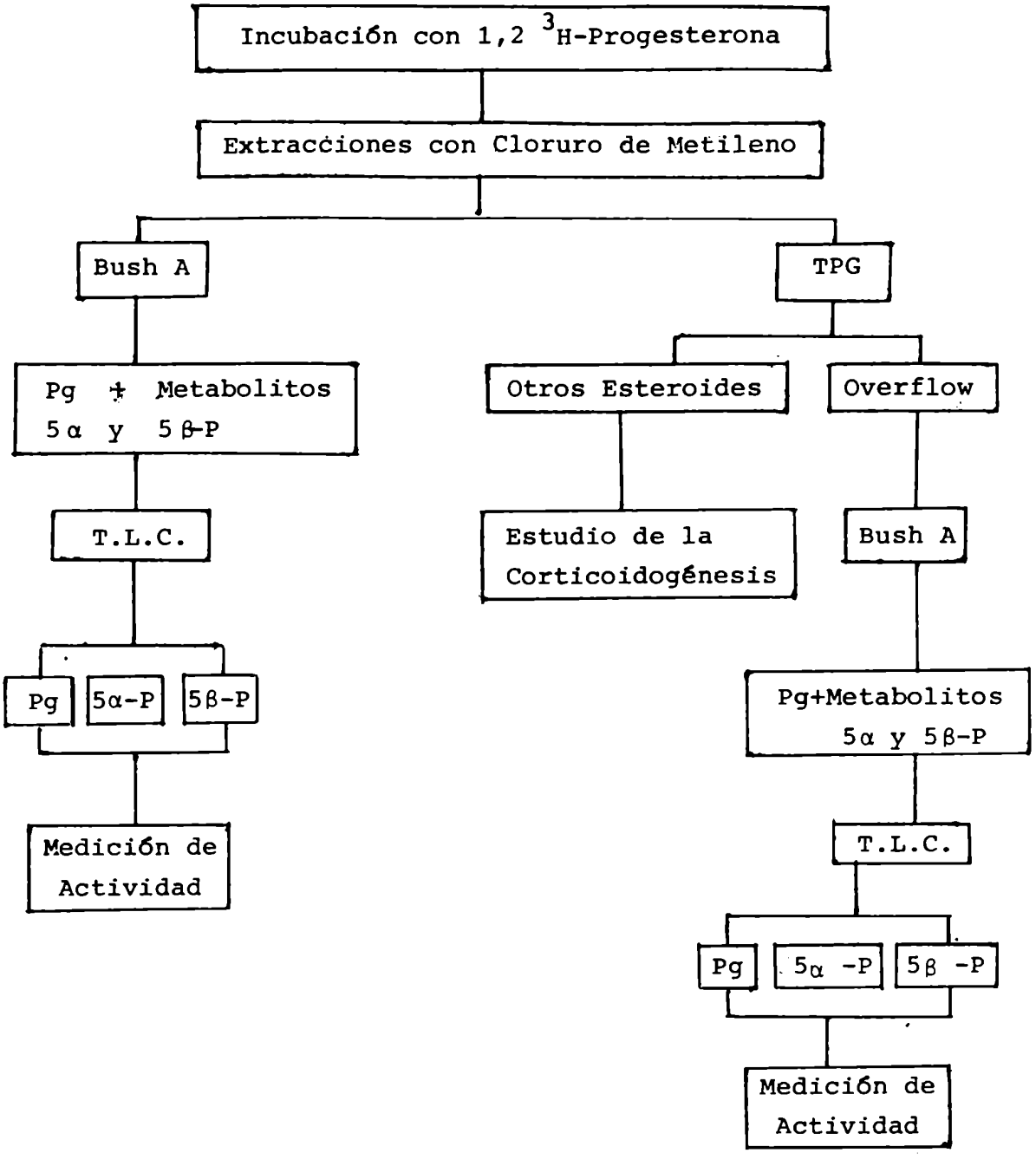

figura n° 23: Secuencia metodológica seguida para el aislamiento de los metabolitos reducidos de la progesterona 5α-P y 5β-P. A partir de incubaciones con ovarios, adrenal e hígado.

1.2.8. Estudio de la Corticoidogénesis en la Adrenal. Aislamiento y Caracterización de los Esteroides

Para el estudio de la corticoidogénesis en el pollo se eluyeron del TPG de las suprarrenales los picos que fueron considerados importantes por la radiactividad que contenían, es decir, las zonas correspondientes al "Origen" y "Corticosterona" en el cromatograma.

Por otro lado, se eluyó también del cromatograma del Bush A de suprarrenal, la zona correspondiente a "DOC", que es más polar que Pg y cualquiera de sus reducidos.

De esta manera se analizaron tres zonas en los cromatogramas de suprarrenal, las correspondientes al "Origen","B" y "DOC" (figuras n°24, 25 y 26 respectivamente).

El eluido del "origen" del TPG se sembró y cromatografió en el sistema Bush B_5, en este sistema fue posible la separación de 18OH-DOC, Cortisol, Aldosterona, Cortisona y 18OH-B, debido a sus diferentes Rf (fig.n°27).

Se eluyó la zona correspondiente a 18OH-DOC "M", se llevó a sequedad bajo N_2 y se mantuvo en metanol durante una semana (1.2.3. b), al cabo de la cual se sembró y cromatografió en TPG (1.2.1.a), obteniéndose ambas formas 18OH-DOC "L" y "M" las que se trataron por separado.

La 18OH-DOC "M" restante se volvió a someter al tratamiento con metanol, cromatografía en TPG, dando entonces la 18OH-DOC "L".

En cambio la 18OH-DOC "L" que se obtuvo del primer TPG, se la mantuvo una semana en forma de residuo seco y luego se sembró nuevamente en TPG, para dar la forma 18OH-DOC "M".

Las zonas correspondientes a Cortisol y Cortisona, se llevaron a sequedad y ambas se sometieron por separado a una acetilación por el método descripto en 1.2.3a; al cabo de la misma se sembraron ambas en TPG y se recuperó del cromatograma los Acetatos de Cortisol y Cortisona respectivamente.

El eluido de la zona correspondiente a Aldosterona, se llevó a sequedad y se lo acetiló (1.2.3a), el Acetato de Aldo así obtenido se lo purificó en el sistema Cidy I (1.2.1c). En este caso el derivado fue sometido a una oxidación con CrO_3 (1.2.3d) y la 11,18 lactona del 21-monoacetato (LAMA) obtenido se purificó en el sistema CyBz (1.2.1d).

Finalmente a la zona correspondiente a 18OH-B, se le realizó el mismo tratamiento que 18OH-DOC, para obtener la forma "L" (1.2.3b), con la única diferencia que los derivados se purificaron en el sistema Bush B_5 (1.4.1b).

Todos estos pasos están esquematizados en la fig.n° 24.

La zona del TPG que coincide con "Corticosterona", se eluyó y llevó a sequedad bajo N_2, luego se procedió a su acetilación utilizando el sistema descripto en 1.2.3a y el Acetato de B obtenido se purificó en Cidy I (1.2.1c).

El acetato de B fue saponificado (1.2.3c) y recroma

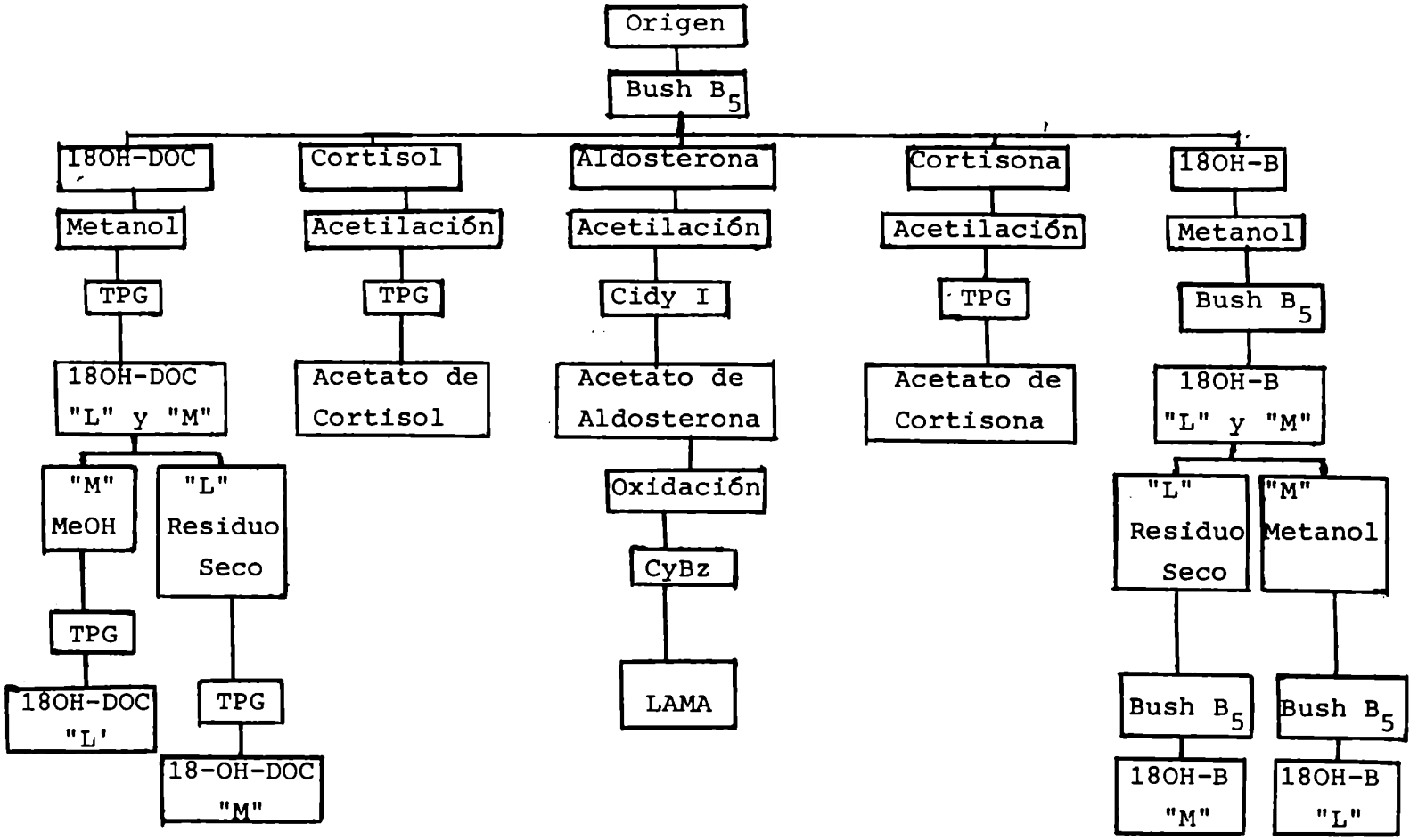

figura n°24: Estudio de la corticoidogénesis en adrenal de embrión de pollo. Secuencia metodológica utilizada a partir de la zona denominada "Origen" del TPG (1.2.1 a) de suprarrenal.

tografiado en TPG (1.2.1a), de donde se eluyó la Corticosterona pura.

Finalmente la zona correspondiente a "DOC" en el Bush A, fue eluida, llevada a sequedad y acetilada (1.2.3a); los Acetatos de DOC así obtenidos se purificaron en el sistema Bush A (1.2.1b).

La purificación y aislamiento de Costicosterona y DOC se esquematizan en las figuras n°25 y 26 respectivamente.

2. RESULTADOS

2.1. Metodológicos

Es importante destacar la buena separación obtenida entre los derivados 5 α y 5β -P entre sí y de Pg en placa delgada por el sistema Heptano-Acetato de Etilo (1.2.2.).

La radiactividad contenida en cada zona se contó directamente sobre la sílica, sin realizar extracciones. Si bien este método produce un poco de quenching, este fue corregido por dos procedimientos, uno de ellos es la utilización de un contador de centelleo líquido que corrige el quenching de cada muestra mediante una ventana automatizada para energía óptima y dirigida por un analizador multicanal; y el otro fue la utilización de un factor de corrección que se obtuvo sembrando patrones de actividad conocida en la placa de sílica y cromatografiados en el mismo sistema.

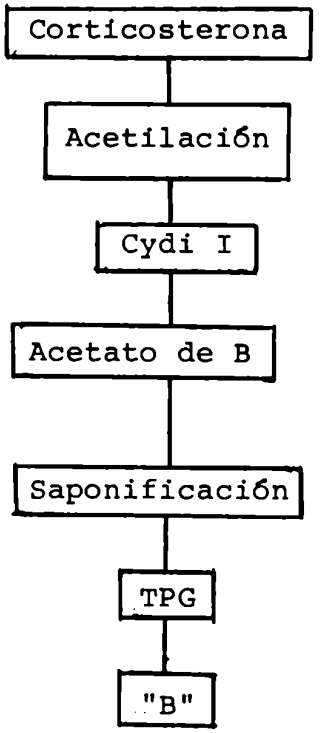

figura n°25: Estudio de la corticoidogénesis en adrenal de embrión de pollo. Secuencia metodológica utilizada a partir de la zona denominada "corticosterona"del TPG (1.2.1 a) de suprarrenal.

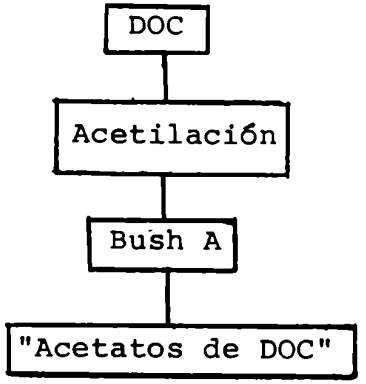

figura n°26: Estudio de la corticoidogénesis en adrenal de embrión de pollo. Secuencia metodológica utilizada a partir de la zona denominada "DOC" del TPG(1.2.1 a) de suprarrenal.

Por cristalización hasta actividad específica constante se pudo comprobar que los resultados obtenidos correspondían a las pregnanodionas puras. (tabla XI).

No fue necesario en el aislamiento de F, Cortisona y DOC, más que un paso de purificación ya que se llegaba a la relación $^{3}H/^{14}C$ constante por ese único mecanismo.

2.2. Bioquímicos

2.2.1. Curvas de Desaparición de ^{3}H-Progesterona en los tejidos Esteroidogénicos e Hígado

En la tabla XII figura el porcentaje de desaparición de ^{3}H-Pg calculado como 100% - % ^{3}H-Pg no metabolizada.

Los métodos estadísticos utilizados fueron los mismos descriptos en el punto I 2.2 de este capítulo.

El metabolismo del sustrato exógeno muestra variaciones características en todos los tejidos durante el desarrollo.

La conversión del sustrato marcado es igual en ambas gonadas en los estadíos iniciales y próximos al nacimiento, pero es mayor en la izquierda respecto de la derecha en los estadíos intermedios.

Las curvas de conversión muestran un máximo en el día 17, y desciende rápidamente hacia el día 19 y recobra su peso en el nacimiento.

Las curvas de la adrenal no muestran un mínimo tan profundo en el día 19 como las curvas del ovario, pero en la adrenal el máximo coincide con el del ovario izquierdo en el día 17.

Tejido	Metabolito N°	cristaliz.	Sistema Sv.	dpm ^{3}H/mg
Adrenal	5β-P	1	EE/HE	2502
		2		2207
		3		2074
		4		2168
	5α-P	1	MeCl/Acetona Agua	2369
		2		2420
		3		1843
		4		1915
Ovario Izquierdo	5β-P	1	EE/HE	16887
		2		16349
		3		16406
		4		16877
	5α-P	1	MeCl/Acetona Agua	938
		2		923
		3		732
		4		951
Ovario Derecho	5β-P	1	EE/HE	18581
		2		17884
		3		17890
		4		17889
	5α-P	1	MeCl/Acetona Agua	680
		2		645
		3		627
		4		648

Tabla XI: Datos cristalización de las pregnanodionas hasta actividad específica constante.

EE: Eter etílico. HE: Heptano. MeCl: Cloruro de Metileno.

El metabolismo del hígado como era de esperar es el más alto.

Tejido	13	15	17	19	R. Nacidos
Hígado	94.8±0.6[a] (9)	82.1±3.6[a] (9)	88.5±0.6[a] (10)	92.7±0.5[a] (9)	94.5±1.5[a] (7)
Adrenal	77.9±1.4[a] (8)	66.8±1.8[a] (9)	76.0±1.9[a] (10)	61.1±2.3[a] (9)	92.9±0.8[a] (9)
Ovario Izquierdo	33.1±4.0[n.s] (9)	64.1±1.5[a] (9)	76.3±3.8[a] (10)	52.1±2.3[a] (9)	69.6±1.3[a] (8)
Ovario Derecho	33.4±2.9 (9)	51.6±0.3 (9)	56.7±2.5 (10)	40.9±3.7 (9)	65.8±2.0 (8)

Tabla XII: Promedio de los valores de desaparición por mg de tejido ± Error st. El número entre paréntesis indica número de muestras incubadas. Se observó heterogeneidad a un valor de $p < 0.001$. Los valores de los tejidos fueron comparados con los del ovario derecho por un "t" de contraste a posteriori.

a: $P<0.001$ n.s.: no significativo.

2.2.2. Metabolismo de Pg en Adrenal

Podemos ver en el cromatograma de la fig. n°27, que ^{3}H-Pg es convertida en al menos diez metabolitos por la adrenal de embrión de 17 días.

A lo largo del desarrollo este modelo es similar y los cambios son simplemente cuantitativos.

Los metabolitos caracterizados por el método descrip

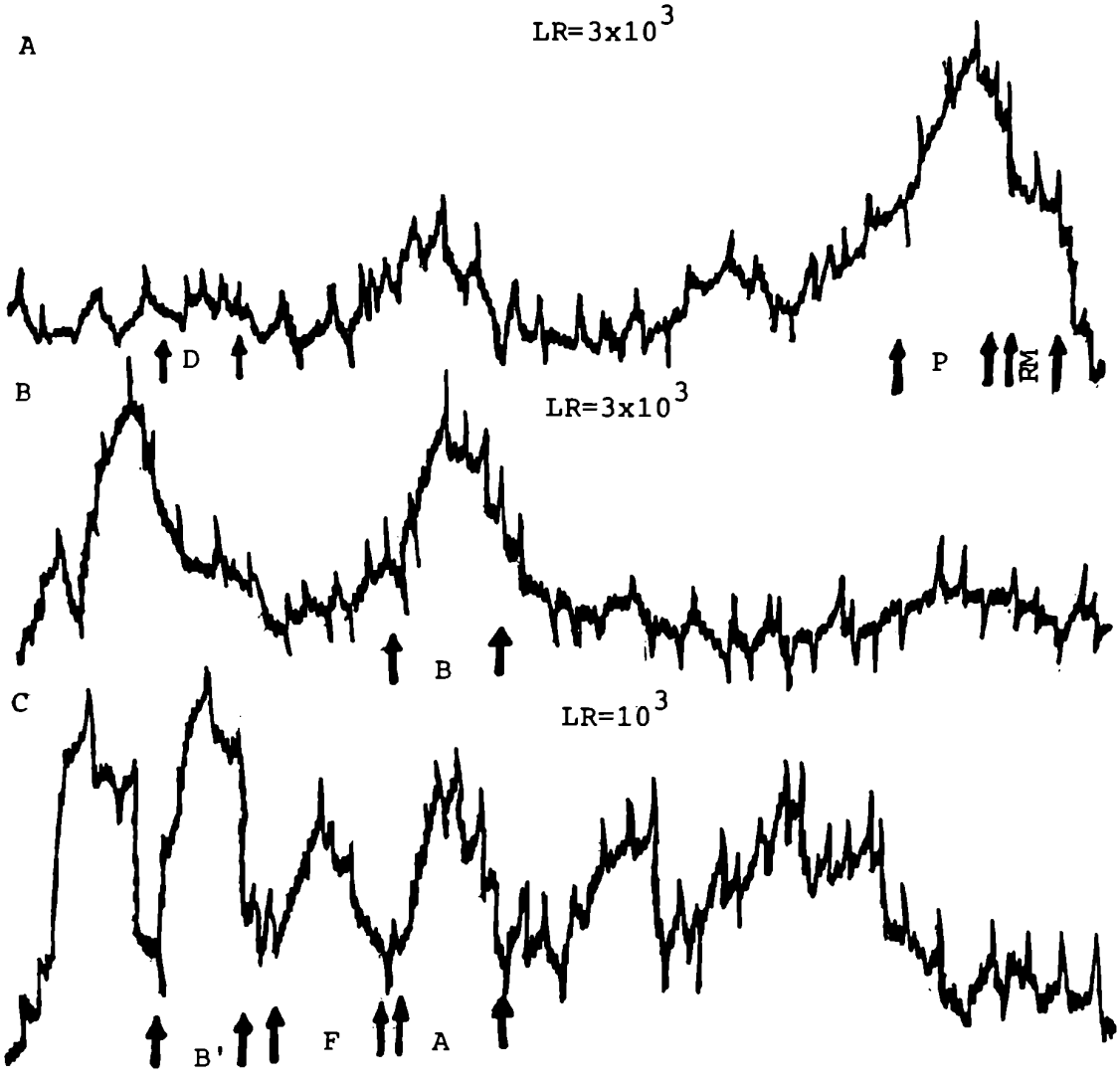

figura n°27: Scanning de un cromatograma correspondiente a la incubación de adrenales de embrión de pollo de 17 días.
A: Scanning del overflow del TPG, desarrollado en el sistema cromatográfico Bush A. Progesterona (P) y su metabolitos reducido (RM) se eluyen juntos y se separan luego por TLC.
B: Scanning del extracto total ciomatografiado en el sistema TPG.
C: Fracción polar al origen del TPG, eluida y cromatografiada en el sistema Bush B_5.
Standards cocromatografiados, progesterona (P), metabolitos reducidos (RM) 11-deoxicorticosterona (D), corticosterona (B), 18OH-B"M" (B') Cortisol (F), Aldosterona (A). El pico inmediatamente a la dereha de A, podría ser la forma "L" de 18OHB (Aragonés y col, 204). Observar diferencias en las atenuaciones.

to son: B, DOC, Aldo, 18OH-DOC y 18OH-B, estos últimos en sus formas "M" y "L".

También fue detectado Cortisol y tentativamente identificado por su movilidad en el sistema Bush B_5. 5α y 5β-preg nanodiona se separaron por placa delgada y se identificaron por cristalización hasta actividad específica constante en presencia de carriers radionertes (tabla XI).

Se puede observar en tabla XI, que se logra constancia de la relación dpm ^3H/mg en ambos ovarios entre la primera y segunda cristalización.

Sólo en la adrenal hay pérdidas más o menos importantes de ^3H.

También podemos ver en la fig.n°27, que el material correspondiente a la zona de B es más abundante que el correspondiente a los otros corticoides en el día 17,esta tendencia se mantiene a lo largo del desarrollo embrionario.

Si comparamos la reducción A/B cis de la Pg con su conversión a corticoides, debemos comparar entonces las cantidades de 5β-P con la de B, principal corticoide sintetizado por la glándula.

El resultado de este estudio se puede ver en la tabla XIII y fig.n°28. La reducción A/B cis predomina en los estadíos tempranos del desarrollo y su valor excede en un factor de 5 al de B.

La relación luego desciende rápidamente hacia el na

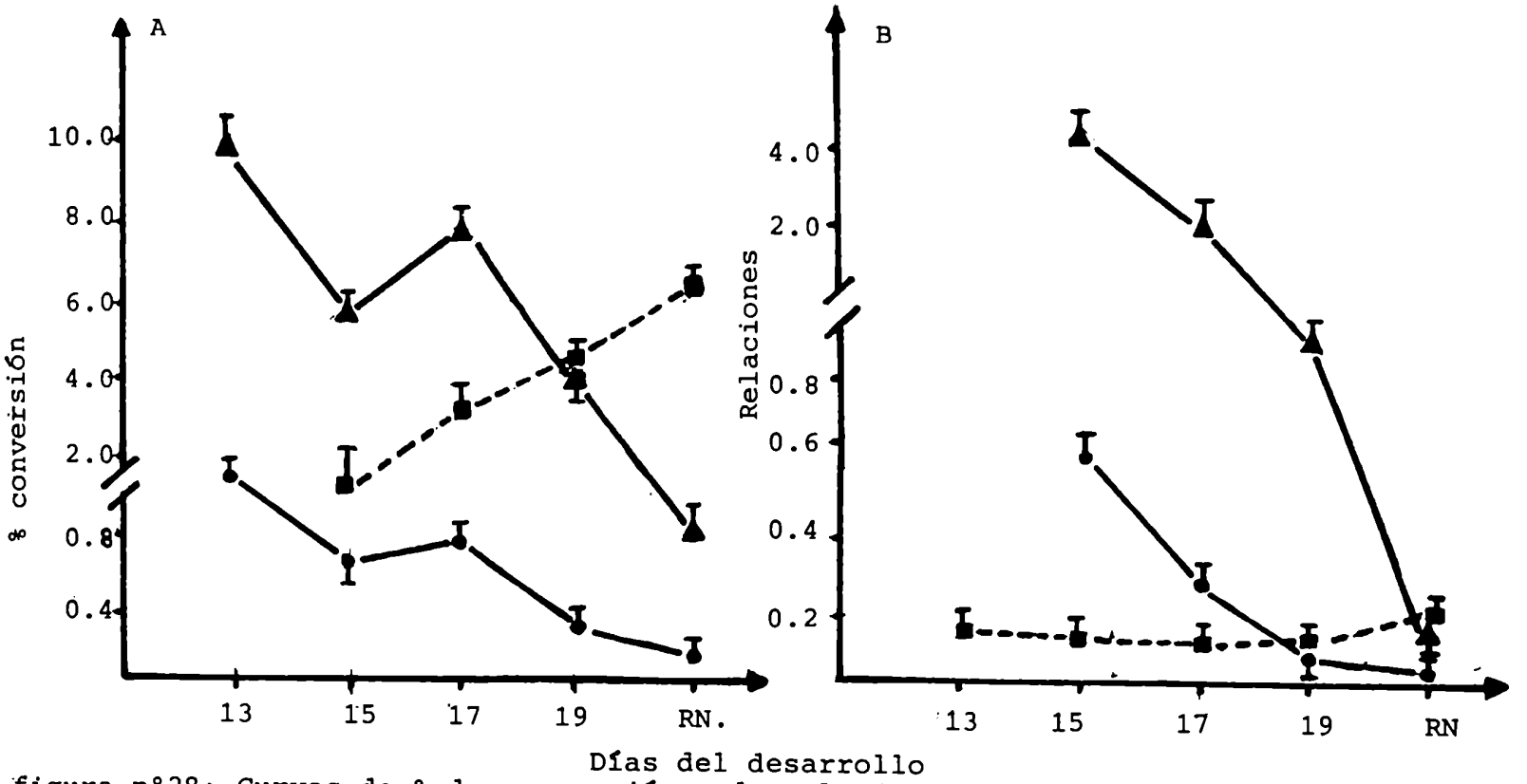

figura n°28: Curvas de % de conversión y de relaciones en Adrenal

A: 5α-P(-•-), 5β-P (-▲-), B(--■--)

B: 5α-P/B(-•-), 5β-P/B(-▲-), 5α-P/5β-P(--■--)
Las curvas de 5α-P(A), 5α-P/B y 5α-P/5β-P(B) corresponden a los valores de y proporcionales a la parte más baja del eje y. 5β-P(A) y 5β-P/B(B) corresponden a los valores de y proporcionales a la parte superior del eje y.
Los valores son promedios de % conversión / 10 mg tejido ± Error standard.

cimiento y en el nacimiento la corticoidogénesis predomina (8 veces mayor) sobre la reducción de Pg.

Gráficamente, vemos la simetría entre las curvas correspondientes a ambos esteroides (fig. 28A) y el descenso exponencial de la relación 5β-P/B en la figura n°28B (conclusiones).

En contraste la relación 5α-Pregnanodiona/Corticosterona, se aproxima a la abcisa asimtóticamente. La reducción A/B cis es un orden de magnitud mayor que los valores obtenidos para la reducción A/B trans y la relación 5α/P 5βP permanece prácticamente constante hasta el día 19, tendiendo luego a aumentar hacia el nacimiento.

Los métodos estadísticos empleados fueron los mismos utilizados en el punto I 2.2 de este capítulo.

Día del desarrollo	5α-Pregnanodiona	5β-Pregnanodiona
13	1.45±0.15	9.8±1.62
15	0.63±0.13	5.60±0.39
17	0.74±0.05	7.96±0.19
19	0.32±0.05	4.01±0.51
R.N.	0.15+0.03	0.86+0.20

Tabla XIII: % de conversión a 5α y 5β-Pregnanodiona por 10 mg de tejido. Anova significativa $p<0.05$, 5β-P día 17 > 15 y día 17 > 19).

2.2.3. Metabolismo Reductivo de Progesterona en Ambos Ovarios

La tabla XIV representa la conversión de H^3 -Progesterona a ambas pregnanodionas por el ovario izquierdo y derecho.

Se observa una importante diferencia entre ambos ovarios, en las curvas correspondientes a 5β-P, durante el desarrollo.

En el OI al igual que ocurre en la adrenal, 5β-P responde a una función ondulatoria que desciende rápidamente con un máximo-menos pronunciado que la adrenal-en el día 17. En el ovario derecho, los niveles de 5β-P cambian en menor proporción durante el desarrollo.

Como consecuencia de esto, la relación 5α-P/5β-P en ambos ovarios obedece a una función totalmente diferente como se puede ver en la fig.29B (conclusiones), en el día 13 esta relación es mayor en el derecho que en el izquierdo mientras que en el nacimiento se invierte.

Sin embargo la reducción A/B cis, en todos los estadíos y en ambos ovarios es mayor que la A/B trans.

La mayor diferencia la encontramos en el día 13 en el ovario izquierdo (16-0.8) y la menor, en el día 13 también pero en el ovario derecho (10.5-1.8).

Los métodos estadísticos empleados fueron los mismos descriptos en el punto I 2.2 de este capítulo.

2.2.4. Metabolismo Reductivo de Progesterona en el Hígado

Estas transformaciones fueron estudiadas en este te

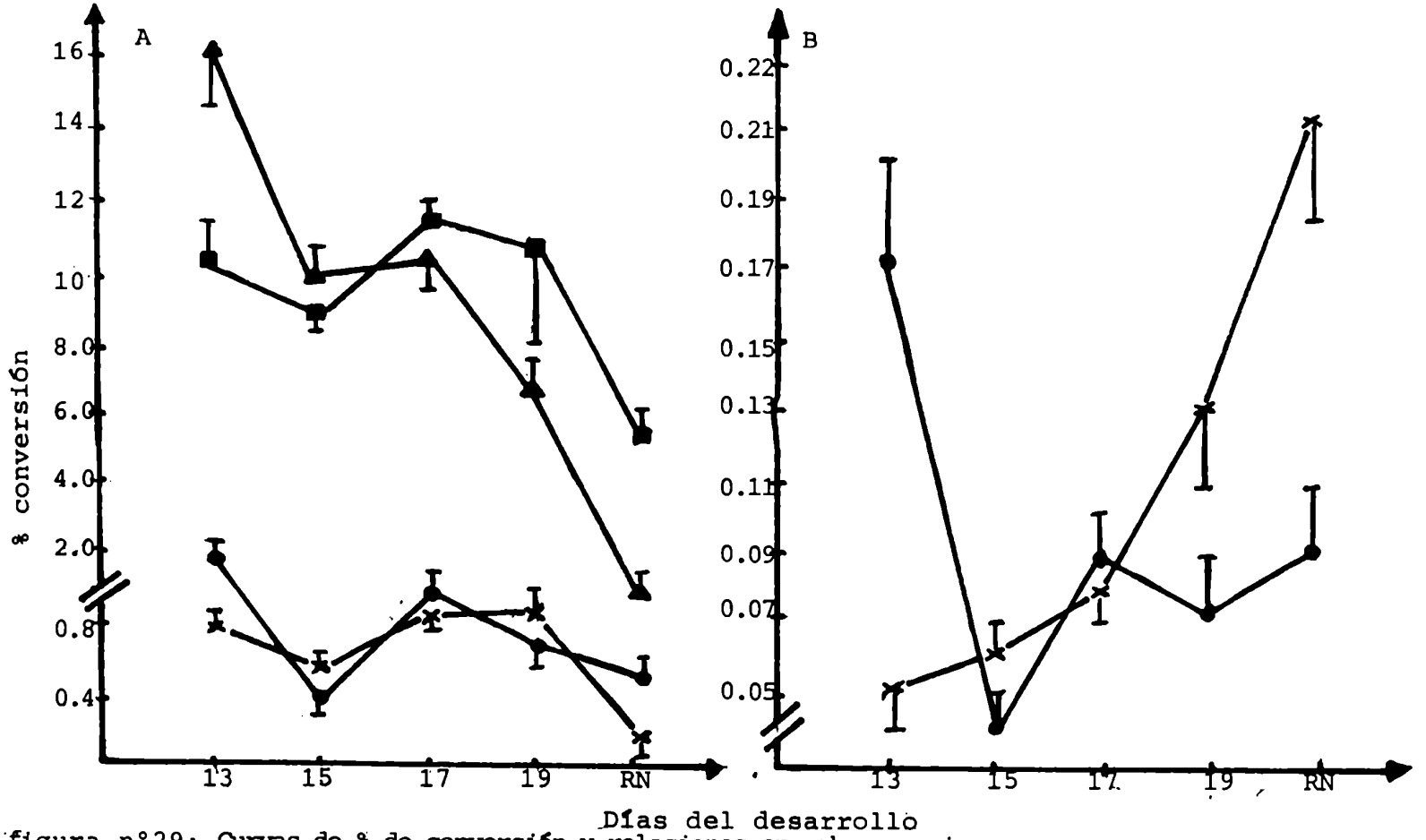

figura n°29: Curvas de % de conversión y relaciones en ambos ovarios.
A: 5α-P(O.D.) (—●—); 5β-P(OD) (—■—); 5α-P(OI (—x—); 5β-P(OI) (—▲—)
B: 5α-P/5β-P(OD) (—●—) y 5α-P/5β-P(OI) (—x—).
(A): Ambas curvas 5β-P corresponden a valores de y proporcionales a la parte superior del eje y; y ambas curvas 5α-P a los valores de y proporcionales a la parte inferior del eje y. Los valores son promedios de % de conversión por 10 mg de tejido ± error standard.

jido con la idea de comparar los resultados en glándulas esteroidogénicas con un clásico tejido metabolizante.

Aunque las curvas de conversión a las dionas en este tejido tienen ciertas similitudes con las de los tejidos esteroidogénicos, tabla XV, la relación 5α/5β responde a una función totalmente diferente.

En el día 13, esa relación es muy alta inclusive mayor a la de cualquiera de los tejidos esteroidogénicos fig. n°30.

En general los datos de conversión a ambas pregnanodionas observados en el hígado son diez veces menor o más que el resto de las glándulas.

Los métodos estadísticos utilizados son los mismos descriptos en el punto I 2.2 de este capítulo.

Días del desarrollo	Ovario Izquierdo		Ovario Derecho	
	5αPregn.	5β-Pregnanodiona	5α-P	5β-P
13	0.79±0.16	16.29±1.78	1.74±0.28	10.36±1.18
15	0.54±0.08	9.79±0.72	0.38±0.05	9.01±0.70
17	0.86±0.06	9.83±0.42	0.98±0.08	11.36±0.53
19	0.84±0.16	6.65±0.95	0.70±0.16	10.46±2.87
RN	0.21±0.06	1.00±0.14	0.47±0.08	5.2 ±0.72

Tabla XIV: % de conversión a 5α y 5β pregnanodiona/10 mg. de tejido en ovario izquierdo y derecho.

Anova significativa $p<0.05$ para ambos ovarios.

OD: 5α-P día 17>15 y día 17>19.

Días del desarrollo	5α-Pregnanodiona	5β-Pregnanodiona
13	0.31±0.07	0.70±0.10
15	0.15±0.04	1.05±0.13
17	0.09±0.01	0.54±0.12
19	0.08±0.005	0.71±0.06
RN	0.08±0.005	0.31±0.11

Tabla XV: % de conversión a 5α y 5β-Pregnanodiona por 10 mg.de tejido en el hígado.

Anova significativa $p<0.05$.

Día 15 > 13 y > 17.

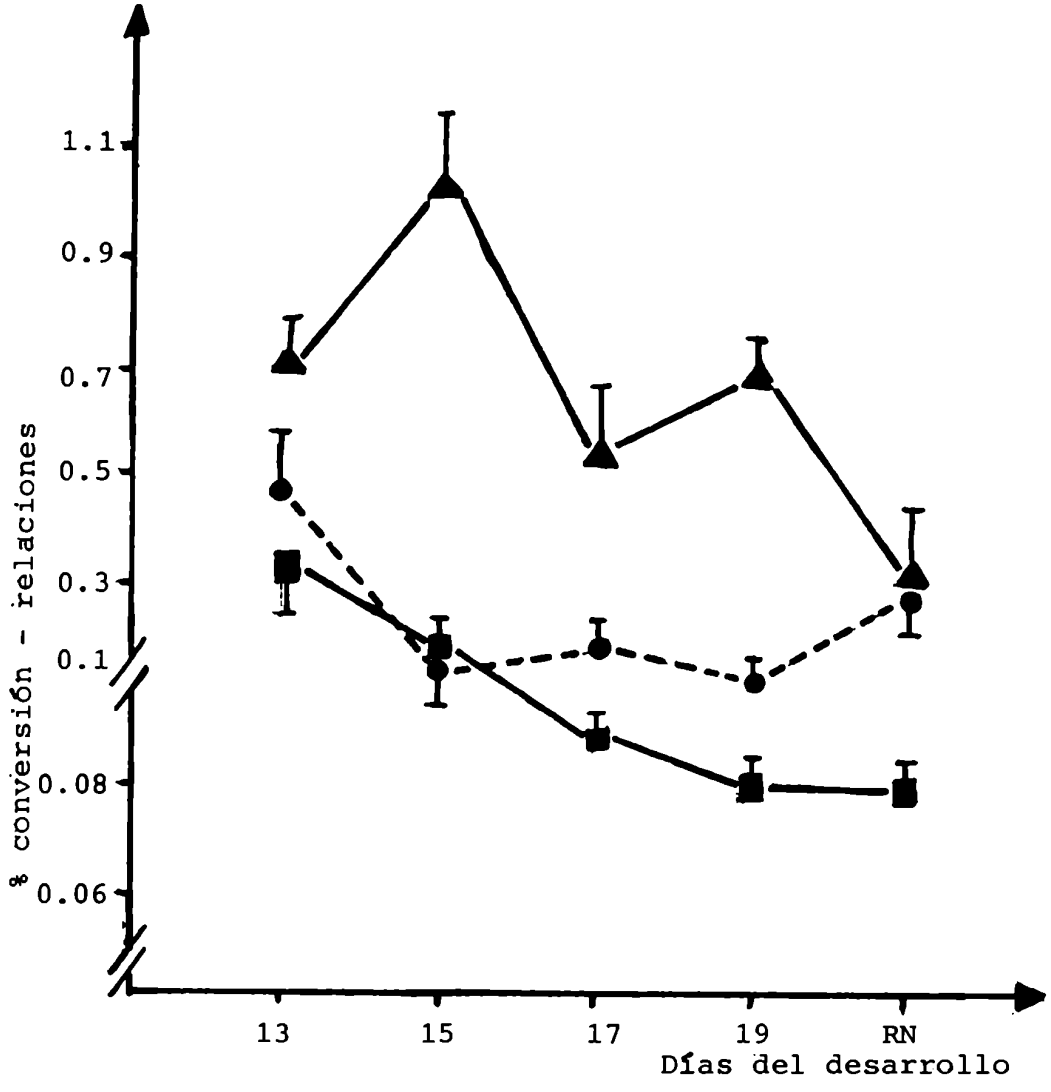

figura n°30: Curvas de % de conversión y relaciones en el hígado.
5α-P (—■—); 5β-P(—▲—); 5α-P/5β-P (—●—)
Los valores del día 13 para 5α-P corresponden a la parte superior y los valores de todos los otros días de esa curva a la parte inferior del eje y. Las curvas 5β-P y 5α-P/5β-P corresponden a valores de y proporcionales a la parte superior del eje y.
Los valores son promedios de % de conversión por 10 mg. de tejido ± standard.

PUNTO III

ACTIVIDAD DE LA δ-ALA-S EN TEJIDO ESTEROIDOGENICO E HIGADO

1. MATERIAL Y METODOS

1.1. Extracción y Preparación de Muestras

Se utilizaron embriones de pollo híbrido doble pechuga, Genética Copp de 13, 15, 17 y 19 días y pollos recien nacidos.

Los embriones se incubaron en una incubadora Marca Alonso, modelo 75, a 37°C y con ambiente humificado durante el tiempo necesario para obtener los estadíos que se estudiaron.

Los animales fueron sacrificados por decapitación y separados por sexo una vez abierto el campo operatorio.

Una vez disecados los adrenales, el hígado y ambos ovarios, se pesaron los tejidos y se prepararon pooles de cada uno de ellos.

1.2. Determinación de la Actividad de la Enzima por Métodos Radiactivos

1.2.1. Síntesis y Aislamiento de δAla Radiactivo a Partir de ^{14}C-Succínico

Se prepararon los homogenatos (20% p/v) en buffer Tris ClH 0,2 M pH:7,4 y se centrifugaron a 1000xg durante 10 minutos. Cada vaso de incubación contendrá 1 ml. del homogenato.

Las condiciones de la incubación se tomaron del método original de Strand y col. (211), modificado luego por Tofilon y Piper (185)para adaptarlo a hígado y tejido esteroidogénico de embrión de pollo.

En nuestro caso hemos hecho estudios previos de estas características a fin de confirmar las mejores condiciones de ensayo para nuestros modelos de investigación.

De acuerdo a lo observado en la tabla XVI, la tioquinasa (0.6 Unidades Kaufman/ml.) obtenida de Sigma Chemical Co (St Lowis, Mo)aumenta la actividad de la enzima en todos los órganos salvo el hígado.

De los cofactores incluídos en la Tabla XVI y listados más abajo originalmente empleados por Strand y col. (211) no tienen influencia en el ensayo, malonato (10 mM), arsenito de sodio (5 mM) y antimicina (2,5 µg/ml).

En cambio el glutation reducido (212) aumenta su actividad.

Dado que la preparación de tioquinasa se obtuvo de hojas de espinaca se utilizó ATP como nucleótido de alta energía.

El pH óptimo para los diferentes tejidos osciló entre 7.2 y 7.6, sin exhibir un máximo de importancia.

La Tabla XVII muestra una curva de actividad vs Tiempo para el embrión de 17 días en cinco intervalos diferentes.

Tejido	Condiciones del medio	Experimento 1 nmol/mg.h	Experimento 2 nmol/mg.h
Hígado	Completo[a]	0.189	0.196
	Sin:		
	malonato	0.192	0.182
	malato	0.185	0.187
	arsenito	0.190	0.197
	antimicina	0.188	0.186
	GSH	0.167	0.170
	Sistema Generador de Succinil-CoA.[b]	0.185	0.189
	Completo, reemplazando b por Succinil=CoA de espinaca[c]	0.192	0.189
Adrenal	Completo[a]	0.309	0.304
	Sin:		
	malonato	0.311	0.312
	malato	0.312	0.315
	arsenito	0.308	0.306
	antimicina	0.306	0.310
	GSH	0.265	0.268
	Sistema Generador Succinil-CoA.[b]	0.248	0.250
	Con medio completo reemplazando b por Succinil-CoA de espinaca[c]	0.311	0.306

Tabla XVI: Efecto de compuesto comunmente utilizados en la producción de δ-Ala-Sintetasa en homogenato de adrenal e hígado.
a: Strand y col (265) b Con el medio completo, sistema generador de Succinil-CoA de Sigma Chemical Co, St.Louis, Mo. c Con el sistema completo y succinil -CoA de espinaca.

Podemos ver que dentro del rango de concentración de proteínas utilizado la reacción es lineal hasta los veinte minutos. En nuestros experimentos mantuvimos la concentración de proteínas dentro de esos límites.

Tiempo Incubación en minutos	Tejido		
	Hígado (150-400) a	Suprarrenal (150-350) a	Ovario Izquierdo (80-250) a
5	5.02±0.76[b]	26.1±1.79	19.28±1.75
10	9.86±1.47	48.3±3.00	40.62±3.66
15	15.08±2.32	77.30±5.10	57.45±5.21
20	18.90±2.62	105.0±6.83	78.30±6.46
30	25.80±3.85	129.00±8.56	92.41±7.52

Tabla XVII: Actividad vs tpo. Embrión 17 días.

a contenido de Proteina de las muestras en mg.

b Ala-S en nmol x 10^{-3}/mg proteína.

Los valores son un promedio de seis ensayos a diferentes concentraciones de proteínas ± error standard.

Dado los resultados obtenidos, la mezcla de incubación contuvo entonces: 1.5 µCi de ácido (1,4)^{14}C-Succínico (Ae 116,8 mCi/nmol); Tris-HCl(pH 7,4) 100mM; Acido Succínico radionerte 125 uM; Glicina 100 mM; EDTA 100 mM, Cloruro de Magnesio 10 mM; ATP 0.5 mM;CoA 20 mM; Fosfato de Piridoxal 0.1 mM; GSH 6 mM; y 0.3 ml. de solución de Succínico Tioquinasa (0.6 Unidades Kaufman/ml).

La incubación se llevó a cabo en un incubador Dubnoff a 37°C durante quince minutos.

Para el aislamiento del δAla formado se utilizó el método de Tofilon y Piper (185) modificado.

Luego de la incubación se precipitaron las proteínas con ácido Tricloacético al 25%, y a cada incubado se le añadió 12.5 umol de succinato de sodio y 25 nmol de Ala como carriers.

Se conservaron las muestras durante toda la noche a 4°C, al término de lo cual se las centrifugó a 5000xg durante quince minutos y se lavó en tres oportunidades el precipitado con 1 ml. de TCA 1% cada vez, y se reunieron los líquidos de lavados y el sobrenadante, Finalmente se ajustó el pH a 3.9 con acetato de sodio 1M pH 6.3.

En estas condiciones se cromatografió la muestra en una columna de intercambio catiónico Dowes 50 (0.8 cm.x5.5cm) previamente equilibrada con acetato de sodio 0.1 M, pH 3,9.

Luego de sembrada la solución se lavó sucesivamente con: a) 3 ml. de acetato de sodio pH 3,9 0.1M.

b) 3 ml. de una mezcla de metanol:acetato de sodio 0.1M, en relación 2:1 (v/v).

c) 2 ml. de HCl 0.01N.

Finalmente se eluyó de la columna el ^{14}C-Ala formado con 3 ml. de una solución de OHNa 1N.

1.2.2. <u>Síntesis y Aislamiento del ^{14}C-Ala-Pirrol</u>

Dado que junto al ^{14}C-Ala pueden ser eluídos sustancias interferentes de idéntico comportamiento cromatográfico, podrían ser eliminados del medio por transformación del ^{14}C-Ala en ^{14}C-Ala Pirrol.

El eluído de HONa 1N de la columna se ajustó a pH 4,6 con ácido acético 4N y se agregaron 200 µl de acetil cetona, calentándolas luego durante veinte minutos a 95°C.

El producto de reacción se purificó por pasaje a través de una columna de intercambio aniónico Dowes 1 (0.8 cm. x 5,5 cm), previamente equilibrada con acetato de sodio 0.05M pH 4.6.

La columna se lavó sucesivamente con:

a) 15 ml. de agua.

b) 5 ml. de ácido acético 1N.

c) 1 ml. de metanol.

El ^{14}C-Ala Pirrol se eluyó con 4 ml. de una solución de metanol:ácido acético 1N en relación 2:1 (v/v).

1.2.3. Medición de la Radiactividad

El eluído de la columna anterior se recogió en viales de vidrio de bajo contenido en potasio, a los que se le añadió 12 ml. de una solución centelladora que contenía 4gs. de 2,5 Difeniloxazol (PPO) y 50 mg de 1,4 p-bis (2-(4 metil-5 fenil-oxazol))benceno (Dimetil POPOP) por litro de una solución de Tolueno: Arcopal N100 en relación 2:1 (v/v).

Los viales fueron tapados y agitados y mantenidos du

rante 6 hs. en oscuridad y baja temperatura para disminuir el fondo, previo a su lectura en un espectrómetro β de centelleo líquido, marca Mark III, modelo 6882 (Tracor Analytic) (206, 207, 208).

Para establecer el porcentaje de recuperación de cada columna se cromatografiaron standards de ^{14}C-Ala de distinta actividad específica. Las actividades específicas de cada muestra fueron calculadas teniendo en consideración el dato de de recuperación hallado en cada columna.

1.2.4. Determinación de Proteínas

Estas fueron determinadas por el método de Lowry etal (213) utilizando seroalbúmina bovina cristalizada como standard.

2. RESULTADOS

Los métodos estadísticos empleados en este caso son los mismos utilizados en el punto I 2.2 de este capítulo.

En las tablas XVIII y XIX se detallan las actividades específicas de la enzima δ-Ala-S y el contenido de proteinas totales; y las actividades por 10 mg de tejido y el peso de cada órgano respectivamente, durante el desarrollo embrionario.

Las actividades específicas en la adrenal en general son altas en los cinco estadíos estudiados y exceden significativamente a las actividades en el hígado en los días 13,

y 19 días. En los estadíos de 13 y 19 días se observan dos máximos relativos, presentando un perfil ondulatorio (Tabla XVIII)

Las correspondientes al OI son también elevadas y se hace más notable en el día 15 al compararla con el hígado.

En cambio en el OD presenta dos estadíos, 13 y 17 días en los que el hígado excede o iguala los valores de actividad específica hallados, mientras que los tres estadíos restantes son comparables al OI y adrenal.

Los tejidos esteroidogénicos, en general poseen en distintos estadíos embrionarios mayor actividad de δ-Ala-S que el hígado. Esto es cierto particularmente para el caso de las glándulas esteroidogénicas que funcionan como glándulas endócrinas en la hembra de las aves, la adrenal y el ovario izquierdo, y aún para algun estadío en el ovario derecho, gonada "no funcionante" (22, 214).

El contenido de proteínas por mg de tejido en las glándulas endócrinas es prácticamente constante y generalmente menor que en el hígado.

Dado que las glándulas endócrinas, esteroidogénicas son pequeñas frente al hígado, estas no son contribuyentes de importancia en la síntesis total de δ-Ala. (Tabla XIX).

En general, entre las glándulas endócrinas el OI presenta una actividad enzimática poco importante con valores, aproximadamente constantes en los primeros estadíos estudiados y con tendencia a disminuir hacia el nacimiento.

Tejido	días del desarrollo				
	13	15	17	19	R.Nacidos
Hígado	0.27±0.02[a] (0.012±0.001)[b] (2)[c]	0.09±0.01 (0.013±0.002) (4)	0.29±0.07 (0.011±0.002) (4)	0.18±0.02 (0.012±0.002) (3)	0.16±0.03 (0.011±0.003) (2)
Adrenal	0.99±0.24[d] (0.004±0.001 (2)	0.38±0.06[e] (0.005±0.001) (4)	0.57±0.07 (0.005±0.002) (4)	0.73±0.07[e] (0.005±0.001) (3)	0.47±0.07 (0.004±0.002) (3)
O.Izq.	0.51±0.03 (0.005±0.001) (2)	0.35±0.06[e] (0.006±0.001) (4)	0.41±0.07 (0.005±0.001) (4)	0.35±0.07[d] (0.006±0.002) (3)	0.33±0.07 (0.004±0.002) (3)
O.Der.	0.15±0.08 (0.008±0.001) (2)	0.41±0.11[e] (0.008±0.001 (4)	0.39±0.26 (0.008±0.004) (4)	0.44±0.16 (0.007±0.001) (3)	0.41±0.05 (0.003±0.001) (3)

Tabla XVIII: Actividad específica y contenido de proteínas durante el desarrollo embrionario. [a] nmol Ala producido/hr. mg proteina. [b] mg de proteina/mg de tejido. [c] número de experimentos. [d] $p<0.01$. [e] $p<0.001$. Los valores son promedios ± error standard. En el análisis estadístico se estudió las diferencias de actividades específicas entre tejidos endócrinos y el hígado.

Mientras que el OD presenta una curva con dos máximos destacables en los días 15 y 19 del desarrollo.

En el caso de la adrenal también se observan dos máximos en los días 13 y 19, mostrando un perfil ondulatorio a lo largo del desarrollo.

Tejido	días del desarrollo				
	13	15	17	19	R.Nacidos
Hígado	0.32±0.02[a] (153.9±0.3)[b]	0.11±0.02 (182.0±0.1)	0.18±0.02 (222.1±0.1)	0.17±0.04 (295.2±0.4)	0.17±0.03) (400.0±0.1)
Adrenal	0.37±0.10 (1.85±0.05)	0.16±0.01 (2.0±0.1)[d]	0.26±0.01 (2.6±0.2)[d]	0.36±0.03 (2.4±0.7)[d]	0.16±0.01 (4.0±0.3)
O.Izq.	0.28±0.02 (2.2±0.1)[d]	0.24±0.04 (3.3±0.3)[d]	0.21±0.02 (4.9±0.5)[d]	0.17±0.01 (5.0±0.1)[ns]	0.15±0.04 (5.2±0.5)
O.Der.	0.13±0.07 (0.8±0.1)[e]	0.36±0.10 (0.9±0.1)[e]	0.27±0.03 (0.8±0.1)[d]	0.36±0.20 (0.9±0.2)	0.15±0.04 (1.8±0.5)

Tabla XIX: Actividad de δ-Ala-S ×10 mg tejido durante el desarrollo y peso de los órganos. a nmol Ala formado/hr. 10 mg tejido. b mg tejido/órgano. c n° experimentos idem valores tabla anterior (XVII). d $p<0.001$. c $p<0.01$. ns: no significativo. El análisis estadístico se aplicó entre cada tejido y el hígado.

PUNTO IV

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE δ-ALA-S EN ADRENAL, COMO CONSECUENCIA DE LA INHIBICION DE LA ESTEROIDOGENESIS POR LA CIANOCETONA Y ESPIRONOLACTONA Y RESTITUCION DE DICHA ACTIVIDAD POR 5β-PREGNANODIONA

1. BREVE INTRODUCCION

Para confirmar la hipótesis surgida de capítulos anteriores, según la cual 5β-pregnanodiona era un inductor fisiológico de la δ-Ala-S, en glándulas esteroidogénicas, tuve que buscar primero la mejor manera de suprimir la producción endógena de este metabolito.

La confirmación de la hipótesis consistiría entonces en:a) la supresión o disminución de la actividad de la δ-Ala-S como consecuencia de aquella anti-esteroidogénesis farmacológica y b) la restitución de la actividad de δ-Ala-S después de administrar exógenamente cantidades fisiológicas de 5β-pregnanodiona.

No se conocen hasta la fecha inhibidores específicos de la 5β-reductasa. Sin embargo, la mezcla de cianocetona y espi

ronolactona resultó en una inhibición eficaz de la $\Delta 5,3\beta OH$ Esteroide dehidrogenasa (215, 216, 217, 218, 219), es decir, de la formación endógena de todos aquellos esteroides que podrían ser precursores inmediatos de los 5β-reducidos, metabolitos que según muchos autores actúan como inductores de la δ-Ala-S(162, 163, 191)-en dosis farmacológicas-.

La cianocetona (2α-ciano-17βOH, 4,4,17αTRIMETIL-ANDROST-5 EN-17βOL-3 CETONA), es un esteroide sintético producido por los Laboratorios Winthrop (N°19.578), potente inhibidor de la actividad de la 3β-OH ESTEROIDE REDUCTASA-Δ5-ISOMERASA IN VITRO E IN VIVO (220, 221).

La espironolactona (3-(3-OXO-7α-ACETILTIO-17β-HIDROXI-4 ANDROSTEN-17α-IL)ACIDO PROPIONICO γ-LACTONA, provista amablemente por la Dra. Selva Cigorraga CENTRO DE ENDOCRINOLOGIA INFANTIL. HOSPITAL DE NIÑOS, BS. AIRES, un antagonista de la aldosterona e inhibidor de la biosíntesis de esteroides, actúa también sobre la 17α-hidroxilasa (218, 219).

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Extracción y Preparación de Muestras

Se utilizaron 200 pollos híbridos doble pechuga, genética Copp de 17 días.

Los animales se sacrificaron por decapitación, se disecaron las adrenales, se pesaron y se separaron en pools.

ronolactona resultó en una inhibición eficaz de la $\Delta 5,3\beta OH$ Esteroide dehidrogenasa (215, 216, 217, 218, 219), es decir, de la formación endógena de todos aquellos esteroides que podrían ser precursores inmediatos de los 5β-reducidos, metabolitos que según muchos autores actúan como inductores de la δ-Ala-S(162, 163, 191)-en dosis farmacológicas-.

La cianocetona (2α-ciano-17βOH, 4,4,17αTRIMETIL-ANDROST-5 EN-17βOL-3 CETONA), es un esteroide sintético producido por los Laboratorios Winthrop (N°19.578), potente inhibidor de la actividad de la 3β-OH ESTEROIDE REDUCTASA-Δ5-ISOMERASA IN VITRO E IN VIVO (220, 221).

La espironolactona (3-(3-OXO-7α-ACETILTIO-17β-HIDROXI-4 ANDROSTEN-17α-IL)ACIDO PROPIONICO γ-LACTONA, provista amablemente por la Dra. Selva Cigorraga CENTRO DE ENDOCRINOLOGIA INFANTIL. HOSPITAL DE NIÑOS, BS. AIRES, un antagonista de la aldosterona e inhibidor de la biosíntesis de esteroides, actúa también sobre la 17α-hidroxilasa (218, 219).

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Extracción y Preparación de Muestras

Se utilizaron 200 pollos híbridos doble pechuga, genética Copp de 17 días.

Los animales se sacrificaron por decapitación, se disecaron las adrenales, se pesaron y se separaron en pools.

2.2. Inhibición y Posterior Restitución de la Actividad de la δ-Ala-S en Adrenal.

a) Determinación del tiempo de máxima inhibición por la mezcla

Previo a la realización de los estudios de inhibición por cianocetona-(CNK) y/o espironolactona (SPNL), determiné el tiempo de máxima inhibición, por la mezcla, de la esteroidogénesis endógena en la adrenal.

Para ello, se preincubaron cuartos de adrenales en presencia de los inhibidores durante 0', 5', 15', 30' y 1 hora.

Luego de la preincubación se determinó la concentración de Progesterona endógena en el tejido, por radioinmunoensayo, por el método descripto en el capítulo II, punto IV.1.2.

tpo	Control (c)	Inhibidores(I)	Relación (C)/(I)
0'	1.89±0.21	1.75±0.12	1.08
5'	1.98±0.07	1.60±0.06	1.24
15'	2.18±0.02	1.55±0.14	1.41
30'	2.07±0.45	1.36±0.20	1.52
60'	2.03±0.36	1.35±0.33	1.50

Tabla XX: Concentración promedio de Progesterona expresada en ng/mg tejido ± Error Standard, en el grupo control y grupo inhibido por CNK+SPNL.

En presencia de ambos, CNK y SPNL, la máxima inhibición de la síntesis de progesterona endógena se obtuvo entre los 30' y 60' de preincubación (Tabla XX).

Por consiguiente se consideró 1 hora como el tiempo de incubación en presencia de inhibidores para los futuros experimentos. Cabe destacar que se eligió la adrenal de 17 días, como tejido de experimentación dado que posee una actividad reductasa comparable con la de los otros tejidos, y en ese estadío (17 días) mayor que en los restantes y una actividad de δ-Ala-S mayor que en los otros tejidos y estadíos. De esta manera no había dudas respecto si la actividad era inhibida realmente o se producía un artefacto en la técnica.

b) Verificación de que CNK+SPNL es inhibidor óptimo de la Progesterona en nuestro sistema. Cálculo del % de inhibición.

Si bien en la bibliografía se demostró que la presencia de ambos inhibidores era muy eficaz para la inhibición de la Δ5, 3βOH Esteroide dehidrogenasa (215, 216, 217, 218, 219)en testículo, quisimos comprobar estos resultados en nuestro sistema, adrenal de pollo hembra.

En este experimento se utilizaron cuartos de adrenal, que se incubaron en presencia de un precursor radiactivo, $7H^3$(N) pregnenolona.

El medio de incubación contenía 2 ml. de buffer Krebs-Ringer-Bicarbonato-Glucosa pH 7,4 (cuya composición se descri-

En presencia de ambos, CNK y SPNL, la máxima inhibición de la síntesis de progesterona endógena se obtuvo entre los 30' y 60' de preincubación (Tabla XX).

Por consiguiente se consideró 1 hora como el tiempo de incubación en presencia de inhibidores para los futuros experimentos. Cabe destacar que se eligió la adrenal de 17 días, como tejido de experimentación dado que posee una actividad reductasa comparable con la de los otros tejidos, y en ese estadío (17 días) mayor que en los restantes y una actividad de δ-Ala-S mayor que en los otros tejidos y estadíos. De esta manera no había dudas respecto si la actividad era inhibida realmente o se producía un artefacto en la técnica.

b) Verificación de que CNK+SPNL es inhibidor óptimo de la Progesterona en nuestro sistema. Cálculo del % de inhibición.

Si bien en la bibliografía se demostró que la presencia de ambos inhibidores era muy eficaz para la inhibición de la Δ5, 3βOH Esteroide dehidrogenasa (215, 216, 217, 218, 219)en testículo, quisimos comprobar estos resultados en nuestro sistema, adrenal de pollo hembra.

En este experimento se utilizaron cuartos de adrenal, que se incubaron en presencia de un precursor radiactivo, $7H^3$(N) pregnenolona.

El medio de incubación contenía 2 ml. de buffer Krebs-Ringer-Bicarbonato-Glucosa pH 7,4 (cuya composición se descri-

be en el punto II 1.2.7.1. de este capítulo), $7H^3$(N)-pregnenolona (Ae:19.3 Ci/mnol)y cianocetona (10^{-5}M) y/o espironolactona (10^{-5}M).

La incubación se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C, bajo atmósfera de carbógeno en un incubador metabólico tipo Dubnoff con agitación constante de 50 ciclos/segundo.

Se añadió aproximadamente 8000 cpm de 4-C^{14}-Progesterona (Ae:57.2^{mCi}/mnol) como tracer y se extrajo 3 veces con 4 ml. cada vez de cloruro de metileno.

Las muestras se llevaron a sequedad y se cromatografiaron primero en el sistema TPG (pto.II. 1.2.1a), y el "overflow" de esta corrida en el sistema Bush A (pto. II.1.2.1b),con el objeto de separar Pregnenolona de Progesterona. Pero como esta separación no fue buena, se recurrió a una nueva cromatografía en placa delgada en el sistema Heptano-Acetato de Etilo (3:1) (pto. II. 1.2.2).

La zona correspondiente a Progesterona, se tomó de la placa mediante el raspado de la sílica, se volcó en viales conteniendo el líquido centellante y se midió la radiactividad en un contador de centelleo líquido (detalles en ptoII.1.2.6 de este capítulo).

El análisis estadístico muestra que ambas, CNK y SPNL inhiben la síntesis de Progesterona. Como era previsible la CNK inhibe en mayor proporción que la SPNL (Tabla XXI).

También muestra que la inhibición de CNK es potencia

da por la presencia de SPNL y que la inhibición obtenida no fue total.

Grupos	dpm de H^3-Progesterona	% inhibición
Control	24.780±1.364	-------
+ CNK	9.218±836 b	62.8%
+ SPNL	17.346±1.692 a	30.0%
+ CNK y SPNL	5.154±506 b	79.2%

Tabla XXI: % de inhibición de la Síntesis de Progesterona calculados respecto de dpm de H^3-Progesterona remanentes en los grupos control e inhibido.

El análisis estadístico se realizó mediante la utilización del test de "t".-

a: $p<0.01$ b: $p<0.001$.

c) Inhibición de la actividad de δ-Ala-S por inhibición de la esteroidogénesis

En condiciones de máxima inhibición de la síntesis de Progesterona y secundariamente la de su metabolito reducido, es probable que se produzca una inhibición o por lo menos una disminución, de la actividad de δ-Ala-S.

Para comprobar este hecho se incubaron homogenatos de suprarrenal (20% P/V en buffer tris-CLH 0.2M pH 7,4) en presencia de ambos inhibidores, en las condiciones descriptas pa

ra medir actividad de δ-Ala-S (pto. III.1.2 de este capítulo). Para eliminar la posibilidad de que esta inhibición de la δ-Ala-S estuviera asociada a la disminución del citocromo P_{450} en lugar de la disminución de los metabolitos 5β-reducidos, se comprobó primero si esta inhibición de la actividad se producía en el hígado.

Los resultados mostraron que no hubo disminución de la actividad de δ-Ala-S por efecto de CNK+SPNL en este tejido.

El esquema utilizado fue el siguiente: Un grupo control, en ausencia de inhibidores, con el objeto de determinar la actividad basal de esta enzima; el grupo solvente, igual al control, pero con el agregado de etilenglicol (solvente utilizado para disolver los inhibidores); el grupo CNK, igual al control, pero con el agregado de CNK (10^{-5}M); el grupo SPNL, igual al control más SPNL (10^{-5}M) y finalmente el grupo CNK+SPNL, en presencia de ambos inhibidores.

El análisis estadístico muestra que, tanto la presencia de CNK como SPNL disminuyen la actividad enzimática. Esta, como en el punto anterior, está más disminuida cuando CNK es el inhibidor utilizado. (Tabla XXII).

La presencia de ambos inhibidores, potencian su acción.

Comparando la inhibición de la síntesis de H^3-Progesterona y por consiguiente la de sus metabolitos reducidos, con la inhibición de la actividad de δ-Ala-S (fig.n°31) obser

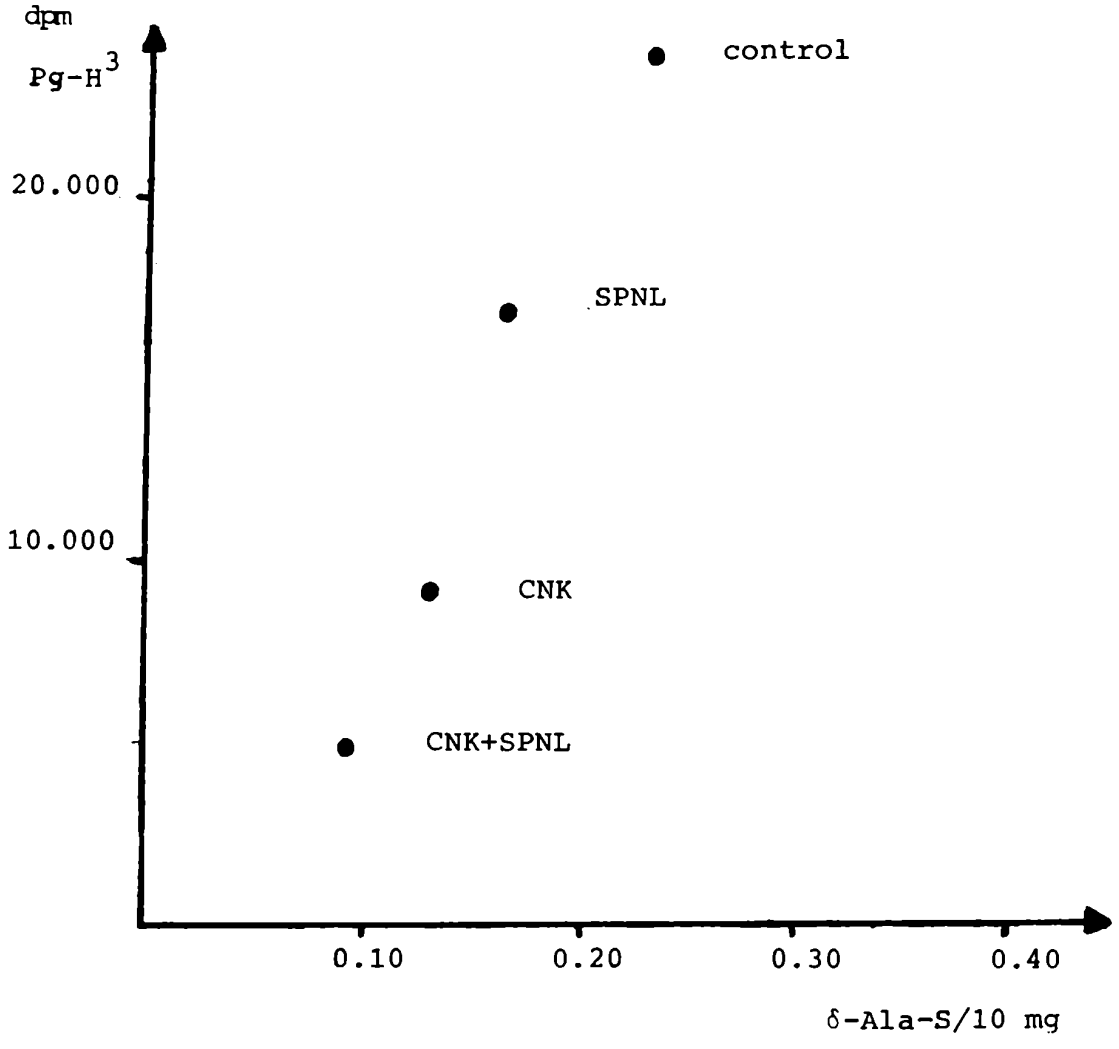

figura n°31; Variación de dpm de Progesterona-H^3 en presencia de inhibidores vs inhibición de actividad de δ-Ala-Sintetasa.

mos una relación lineal entre ambas, lo que apoyaría nuestra hipotesis de trabajo, respecto de la inducción de la actividad enzimática por acción de 5β-P.

Grupos	Actividad por 10 mg tejido	X±Error st
Control	0.26 0.27 0.23 0.25	0.25±0.01
Solvente	0.20 0.24 0.18 0.25	ns 0.22±0.02
CNK	0.13 0.12 0.17 0.12	0.135±0.01[b]
SPNL	0.18 0.14 0.15 0.22	0.17±0.02[a]
CNK-SPNL	0.09 0.13 0.08 0.08	0.095±0.01[a]

Tabla XXII: Actividad de δ-Ala-S expresada como nmol δAla producido/10 mg tejido x 1 hora ± error standard.
El análisis estadístico se realizó mediante la utilización del test de "t",respecto del grupo control.

b:p<0.001

a: p<0.001 ns: no significativo

d) Restitución de la actividad de δ-Ala-S por efecto de 5β pregnanodiona

Este ensayo de actividad δ-Ala-S (detallado en el punto III; 1.2 de este capítulo), se realizará en condiciones de máxima inhibición, según los resultados obtenidos en los puntos anteriores a), b) y c). Es decir se incubará durante 1 hora y se utilizarán ambos inhibidores juntos.

El esquema propuesto es el siguiente: grupo control, en ausencia de inhibidores y/o activadores para determinar actividad basal de la enzima; grupo inhibido, igual al control pero en presencia de CNK (10^{-5}M) y SPNL (10^{-5}M); grupo estimulado, igual al control, pero en presencia de 5β-pregnanodiona (Sigma Chemical Co, $5x10^{-7}$M) y finalmente el grupo restituído igual al control, con el agregado de ambos inhibidores y 5β - pregnanodiona.

Se determinó la concentración de proteinas por el método de Lowry ycol (213), utilizando seroalbúmina bovina cristalina como standard.

3. RESULTADOS

El método estadístico utilizado fue una anova de dos factores empleando el test de homogeneidad de Bartlett. Los contrastes a posteriori se realizaron para una población heterogenea de acuerdo a Tukey-Kramer o Scheffé (135, 136).

Grupo	Actividad x 10 mg tejido	Actividad x mg proteina
Control	0.022 0.018 0.019 0.020	0.137 0.114 0.117 0.128
$\bar{X} \pm$ Error st	0.020±0.001	0.124±0.005
Inhibido	0.016 0.013 0.011 0.015	0.105 0.085 0.071 0.093
$\bar{X} \pm$ Error st	0.014±0.001	0.088±0.007
Estimulado	0.041 0.035 0.031 0.044	0.256 0.222 0.197 0.279
$\bar{X} \pm$ Error st	0.038±0.003	0.238±0.018
Restituído	0.010 0.017 0.024 0.038	0.064 0.105 0.133 0.240
$\bar{X} \pm$ Error st	0.021±0.006	0.135±0.038

Tabla XXIII: Inhibición de la actividad de δ-Ala-S por CNK+SPNL y restitución de dicha actividad por 5β-pregnanodiona, expresada en nmol δ-Ala/hr. x 10 mg. de tejido y x mg proteína.

El análisis estadístico demuestra que hay variabilidad dentro del factor Actividad Enzimática.

F 6.50 $P<0.01$

Los contrastes a posteriori muestran que el control

es menor que el estimulado y mayor que el inhibido. Además se observa que el control es igual al restituído.

Fte.Variación	Fobs.	P.
Acitividad Enzimática	6,50	P<0.01
Estimulado	10.08	P<0.01
Inhibido	7.04	P<0.05
Control	2.37	No Signif.

Se observa aquí nuevamente una disminución de la actividad enzimática por efecto de ambos, CNK y SPNL, del orden de un 30%.

La acción del metabolito de la Progesterona, 5β-Pregnanodiona sobre la actividad de δ-Ala-S, en contraste, resulta en un aumento de dicha actividad que se aproxima al 90%.

La presencia de ambos factores, inhibidor de la síntesis esteroidogénica e inductor de la actividad de δ-Ala-S,resulta en la total restitución de dicha actividad a valores control.

CONCLUSIONES GENERALES DEL CAPITULO

A) PROGESTERONA ENDOGENA POR LA ADRENAL

1. La adrenal no posee un máximo en la concentración de Pg endógena, (como ocurre con el ovario izquierdo y derecho, capítulo II, fig.n°32) en ninguno de los estadíos estudiados. Por el contrario los valores de concentración son aproximadamente constantes.

2. Comparados con las concentraciones obtenidas para el ovario izquierdo y derecho (capítulo II, fig. n°32), son en general bajas.

3. La presencia de Pg endógena en todos los estadíos, pone de manifiesto la presencia de actividad 3β -OH Esteroide Dehidrogenasa en los tejidos esteroidogénicos.

4. Por consiguiente la importancia de la determinación del pool endógeno reside en su posible influencia sobre la concentración de sustrato al tiempo cero, sobre las velocidades de conversión a los metabolitos reducidos, de lo que deducimos que, ni los valores absolutos del pool inicial de Progesterona, ni las diferencias observadas en los estadíos estudiados, hacen pensar en una alteración en las velocidades de conversión, salvo el día 19 en el ovario izquierdo y derecho (fig.n°32; datos capítulo II).

B) CORTICOIDOGENESIS EN GLANDULA ADRENAL

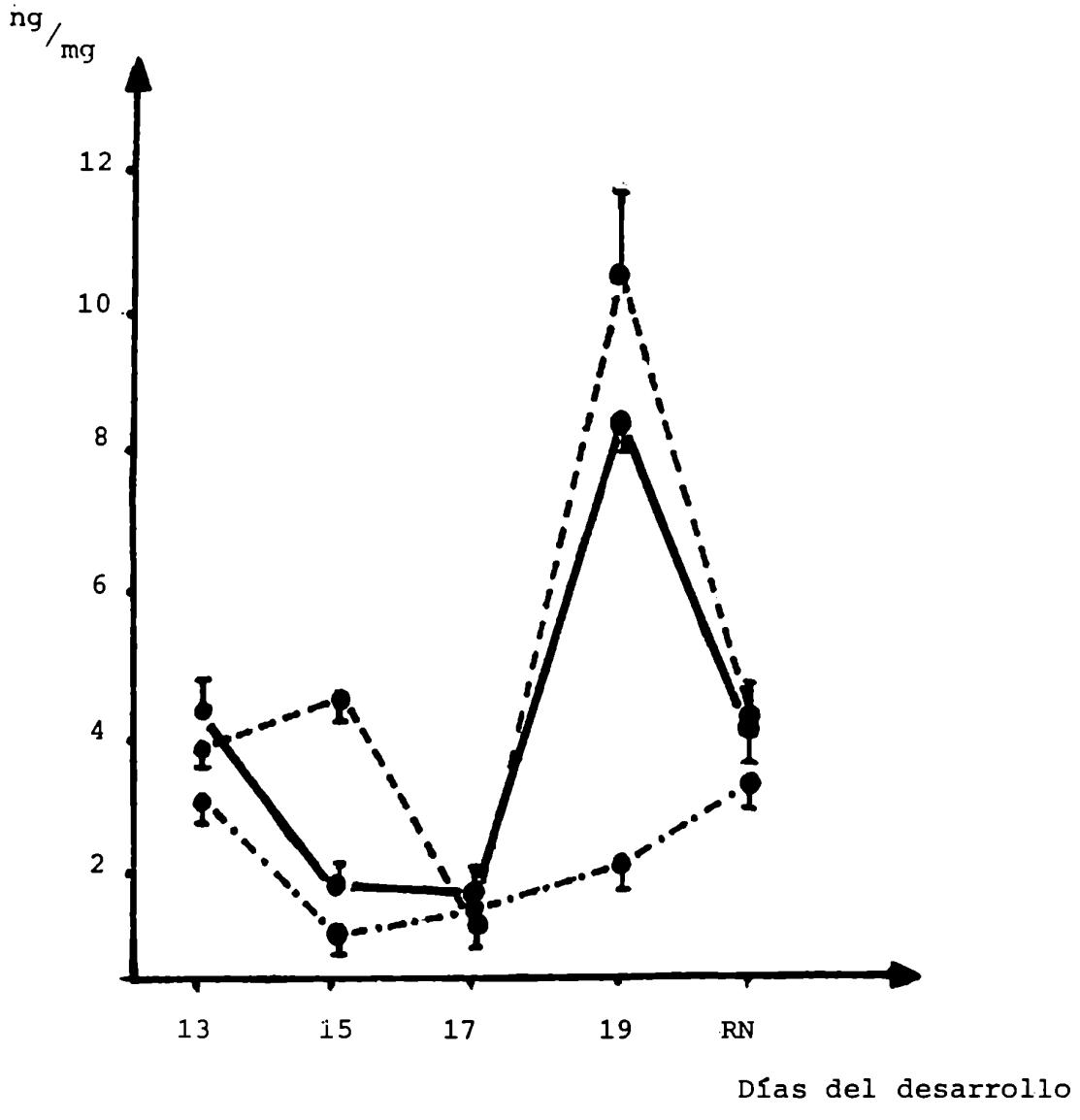

figura n°32; Determinación de Pg endógena en ovario izquierdo (—), ovario derecho (---) y adrenal (-·-·) de embrión de pollo en ng/mg de tejido.

1. Progesterona es convertida en, al menos, 10 metabolitos por la adrenal de embrión de pollo de 17 días (fig. n° 27)

2. Se lograron caracterizar: Corticosterona, 11-dehidro-Corticosterona, Aldosterona, 18OH-DOC, 18OH-B, en sus formas "M" y "L", DOC, CORTISOL (no fue totalmente confirmado), 5α-pregnanodiona y 5β-pregnanodiona.

3. Corticosterona en este estadío, es el corticoide sintetizado en mayor cantidad, y su concentración aumenta rápidamente hacia el nacimiento. (fig. n°33).

C) METABOLISMO REDUCTIVO DE LA PROGESTERONA EN TEJIDOS ESTEREOIDOGENICOS

1. En adrenal, la reducción a la forma 5β-P predomina en los primeros estadíos del desarrollo, inclusive supera los valores correspondientes a corticosterona. Desciende luego hacia el nacimiento. (fig. n°33).

2. 5α-P presenta un perfil similar en este mismo tejido y es siempre sintetizado en menor cantidad que 5β-P.

3. En el nacimiento la corticoidogenesis predomina sobre la reducción de Progesterona.

4. Se observa en este período embrionario una simetría entre el aumento de la corticoidogénesis y la disminución de las 5β-reducidos, que se perfila hacia el nacimiento (fig.n°33).

5. En ambos ovarios, el perfil observado es similar a la adrenal, ambos presentan una función ondulatoria que desciende

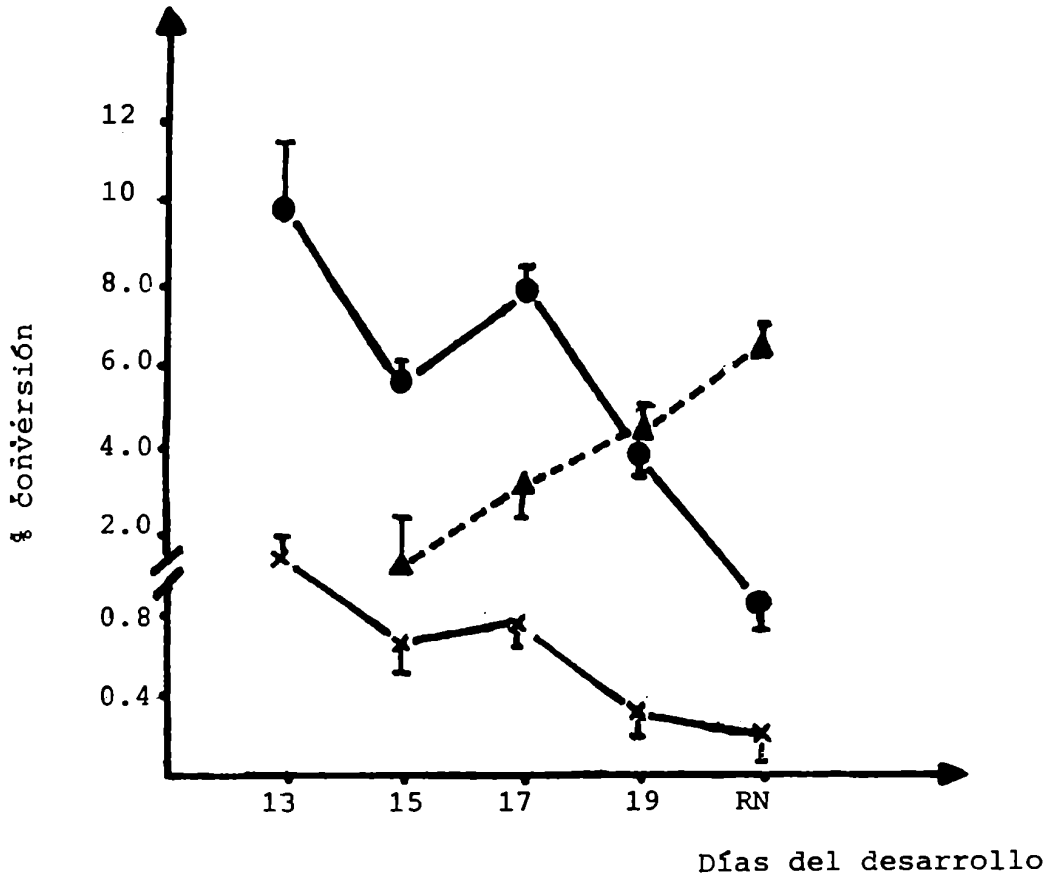

figura n°33: % Conversión de Progesterona-H^3/10 mg tejido a corticosterona (--■--) 5α-pregnanodiona (-●-) y 5β-pregnanodiona (-▲-) en adrenal durante el desarrollo embrionario.

rápidamente (fig. n°34).

6. La conversión a 5β-P es siempre mayor que a 5α-P, tanto en ovario derecho como izquierdo.

7. Se pone de manifiesto la importancia cuantitativa de la reducción de Progesterona a 5β-P en esta segunda mitad del desarrollo embrionario en las glándulas esteroidogénicas estudiadas.

8. Se logró caracterizar el metabolito 5α-reducido en todos los tejidos y estadíos estudiados. Su transformación es aproximadamente diez veces menor que su epímero 5β-P.

9. La reducción en hígado es menor que en todos los tejidos esteroidogénicos estudiados (fig. n°33, 34, 35).

D) ACTIVIDAD DE LA δ-ALA-S EN TEJIDOS ESTEROIDOGENICOS

1. Se determinaron las condiciones óptimas de pH, cofactores y tiempo para medir actividad de δ-Ala-S en tejidos esteroidogénicos de embrión de pollo hembra.

2. La actividad específica de la δ-Ala-S en adrenal es mayor que en los otros tejidos esteroidogénicos estudiados. En todos los tejidos esteroidogénicos estudiados es mayor que en el hígado. (fig. n°36).

3. Considerando la actividad total de la δ-Ala-S por órgano, los tejidos esteroidogénicos son pobres contribuyentes fisiológicos en la síntesis de δ-Ala, dado su pequeño tamaño.

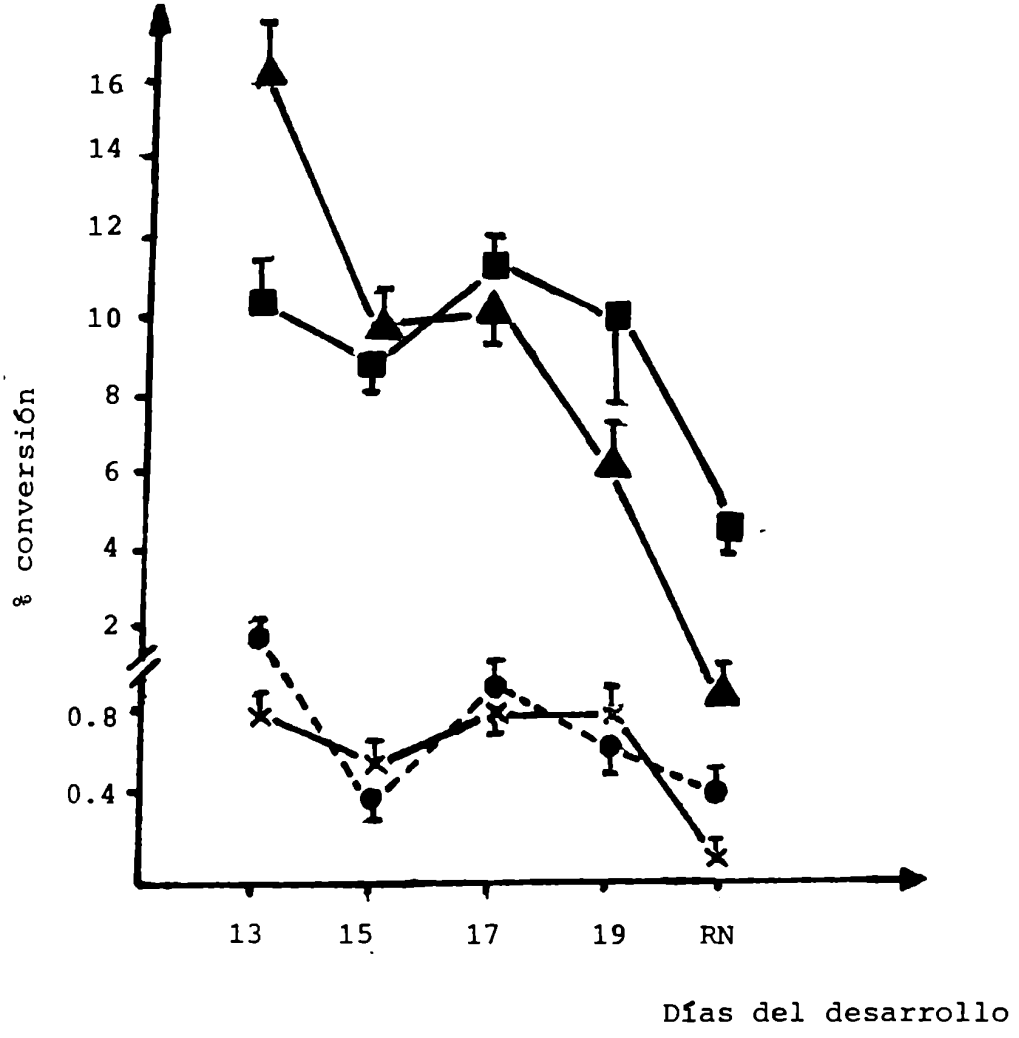

figura n°34: % Conversión/10 mg tejido de Progesterona-^{3}H a 5α-pregnanodiona y 5β-pregnanodiona en ovario izquierdo (-x-) (-▲-) y ovario derecho (--●--) (-■-) durante el desarrollo embrionario.

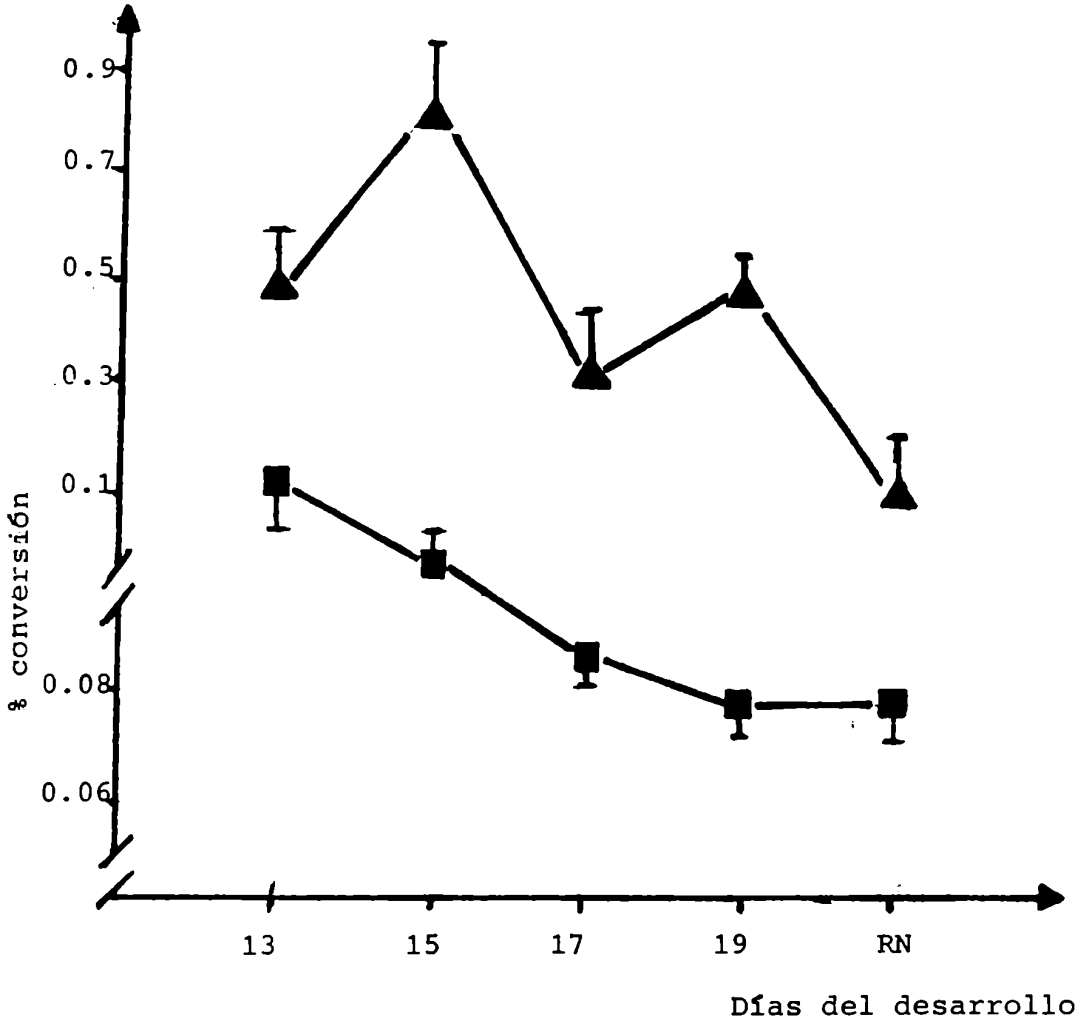

figura n°35: % de conversión/10 mg tejido de Progesterona-^{3}H a 5α-pregnanodiona (-■-) y 5β-pregnanodiona (-▲-) en hígado durante el desarrollo embrionario,

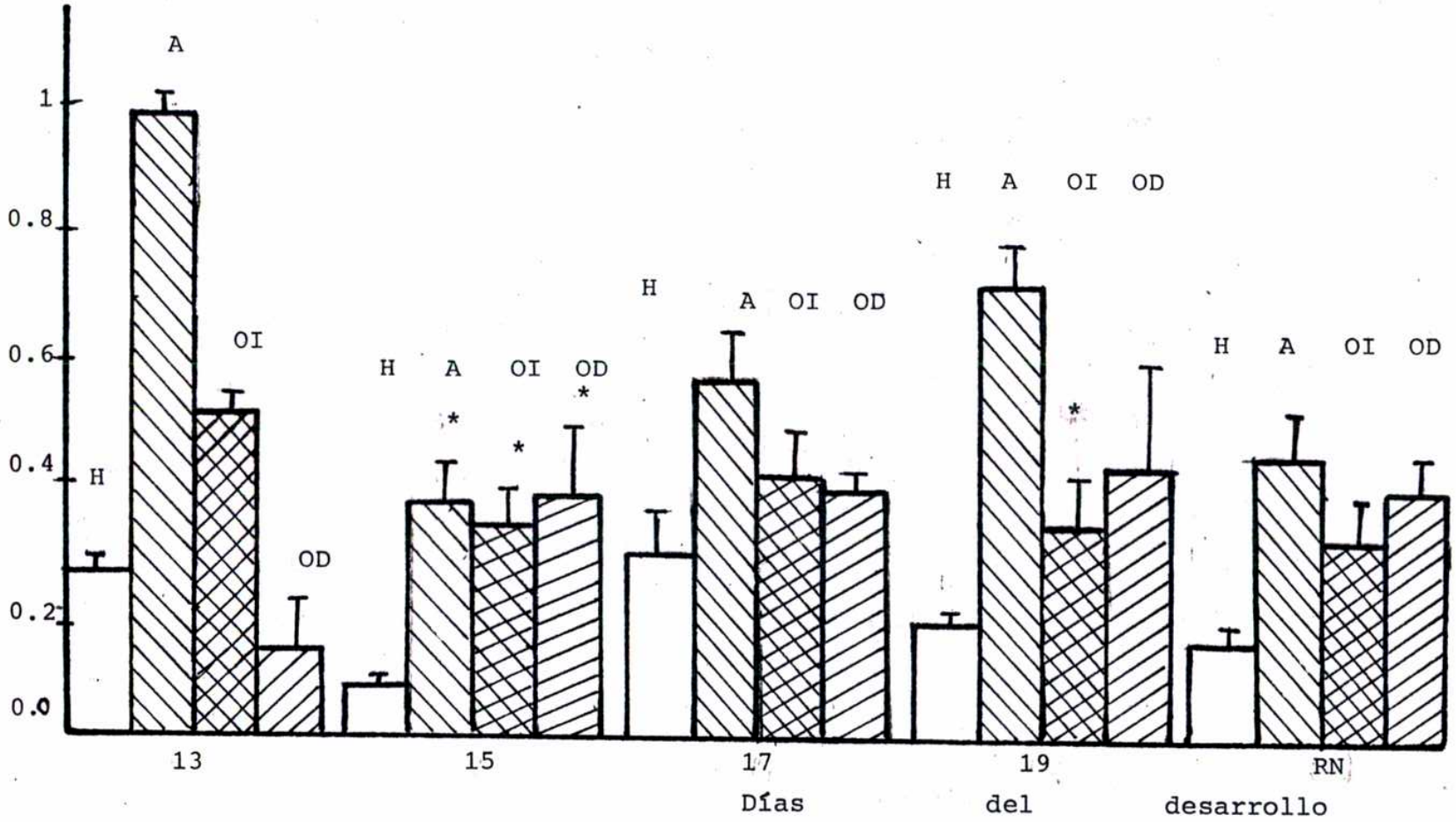

figura n°36: Actividad específica de δ-Ala-S expresada como nmol ALA/hora x mg proteína en Hígado Adrenal, ovario izquierdo y ovario derecho de embrión de pollo durante el desarrollo.

E) RELACION ENTRE LOS PERFILES FISIOLOGICOS DE LA δ-ALA-S Y 5β-PREGNANODIONA (PROBABLE INDUCTOR DE LA ENZIMA)

1. Existe una cierta relación entre las curvas de 5β-P y δ-Ala-S en el OI del embrión ya que ambas tienden a disminuir hacia el nacimiento. (fig. n°38).

2. Esta relación no es lineal, los niveles de reductasa disminuyen 16 veces desde el día 13 hasta el nacimiento. Y en este período δ-Ala-Sintetasa disminuye sólo a la mitad.

3. Existe también relación entre las curvas de reductasa y δ-Ala-S en las adrenales embriónicas, ya que ambas presentan un perfil ondulatorio y poseen dos máximos. (fig. n°37).

4. Los niveles de reductasa en este tejido descienden 10 veces desde el día 13 hasta el nacimiento y δ-Ala-S lo hace sólo a la mitad.

5. Ni las diferencias observadas en la disminución de la actividad; ni en el caso de las adrenales, el pequeño desfasaje entre el último máximo de la reductasa y el máximo de actividad de δ-Ala-S, serían motivo para alejarnos de la hipótesis de un probable inductor en estos tejidos. (fig. n°37, 38).

6. El ovario derecho "no funcionante", no presenta una relación entre los perfiles de 5β-P y δ-Ala. (fig. n°38).

7. Sin querer forzar los argumentos, el ovario izquierdo presenta una buena correlación absoluta entre 5β-pregnanodiona (por 10 mg. de tejido) y δ-Ala-Sintetasa (por 10 mg.de tejido). En

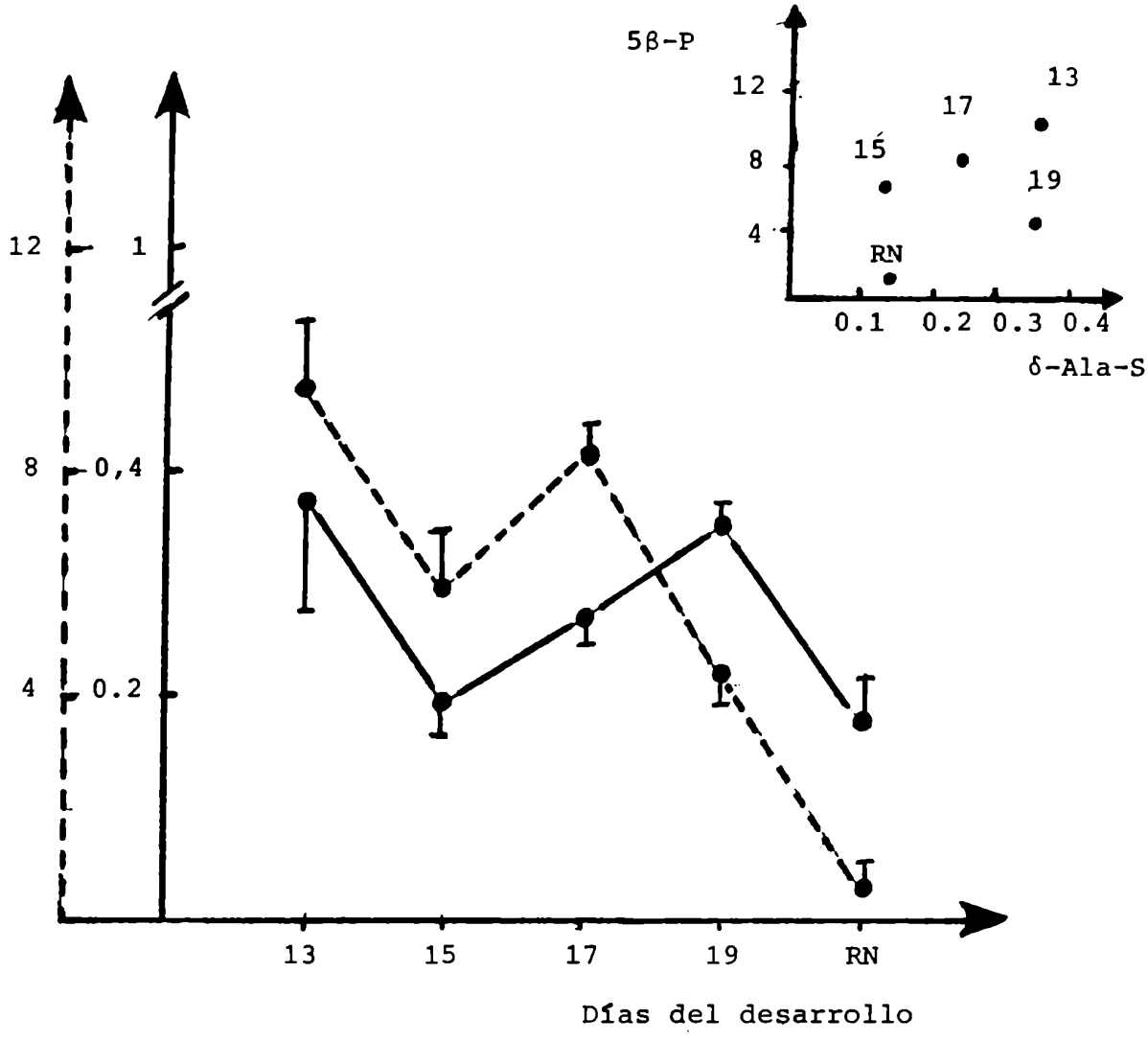

figura n°37: δ-Ala-S/10 mg tejido (—) y 5β-P/10 mg tejido (----) en adrenal de embrión durante el desarrollo embrionario. Cuadro superior: Relación 5β-P/10 mg tejido a δ-Ala-S/10 mg tejido en cada estadío.

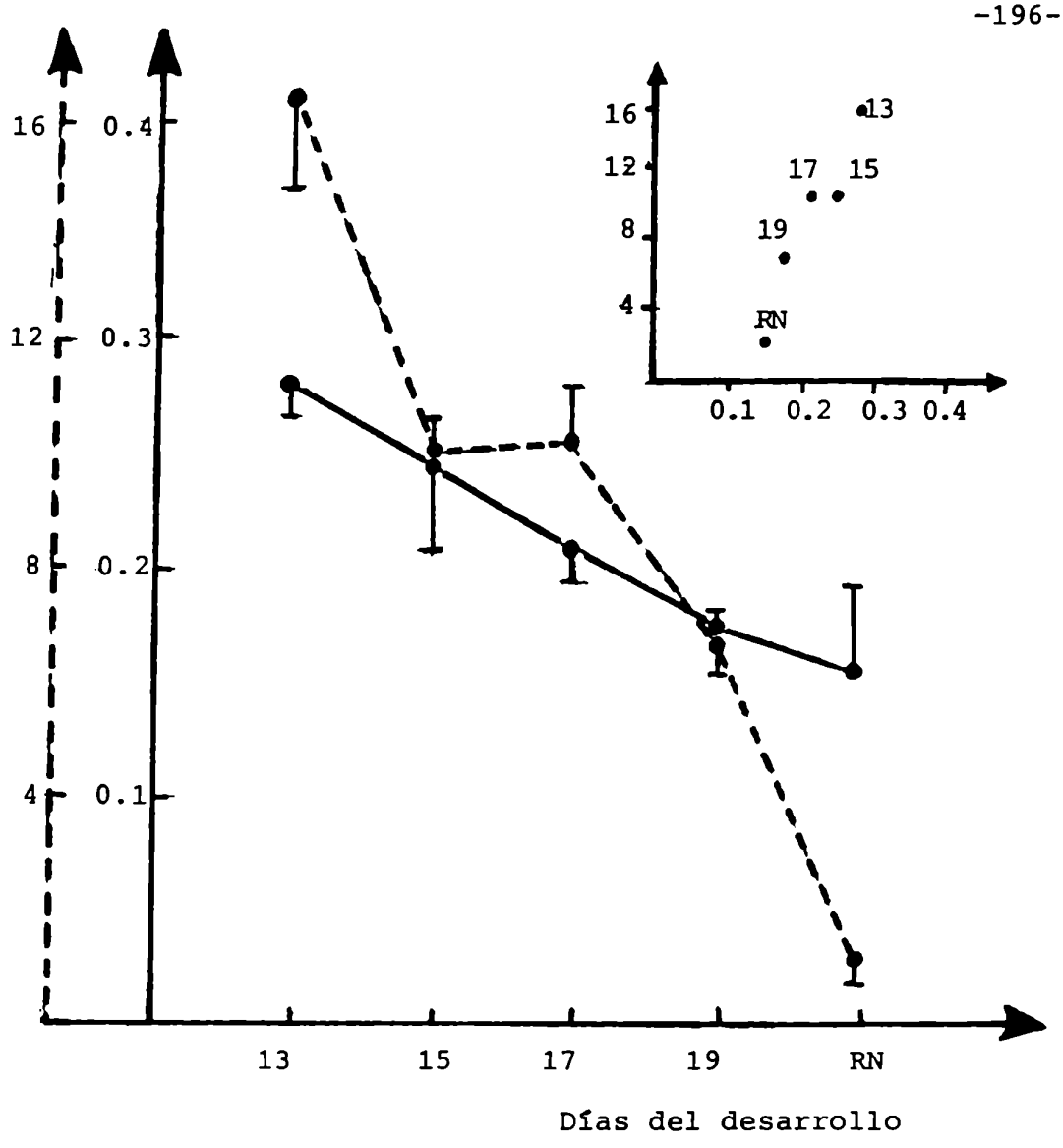

figura n°38: δ-Ala-S/10 mg tejido (—) y 5β-P/10 mg tejido (---) en ovario izquierdo de embrión durante el desarrollo. Cuadro superior: Relación 5β-P/10 mg tejido a δ-Ala-S/10 mg tejido, en cada estadío del desarrollo.

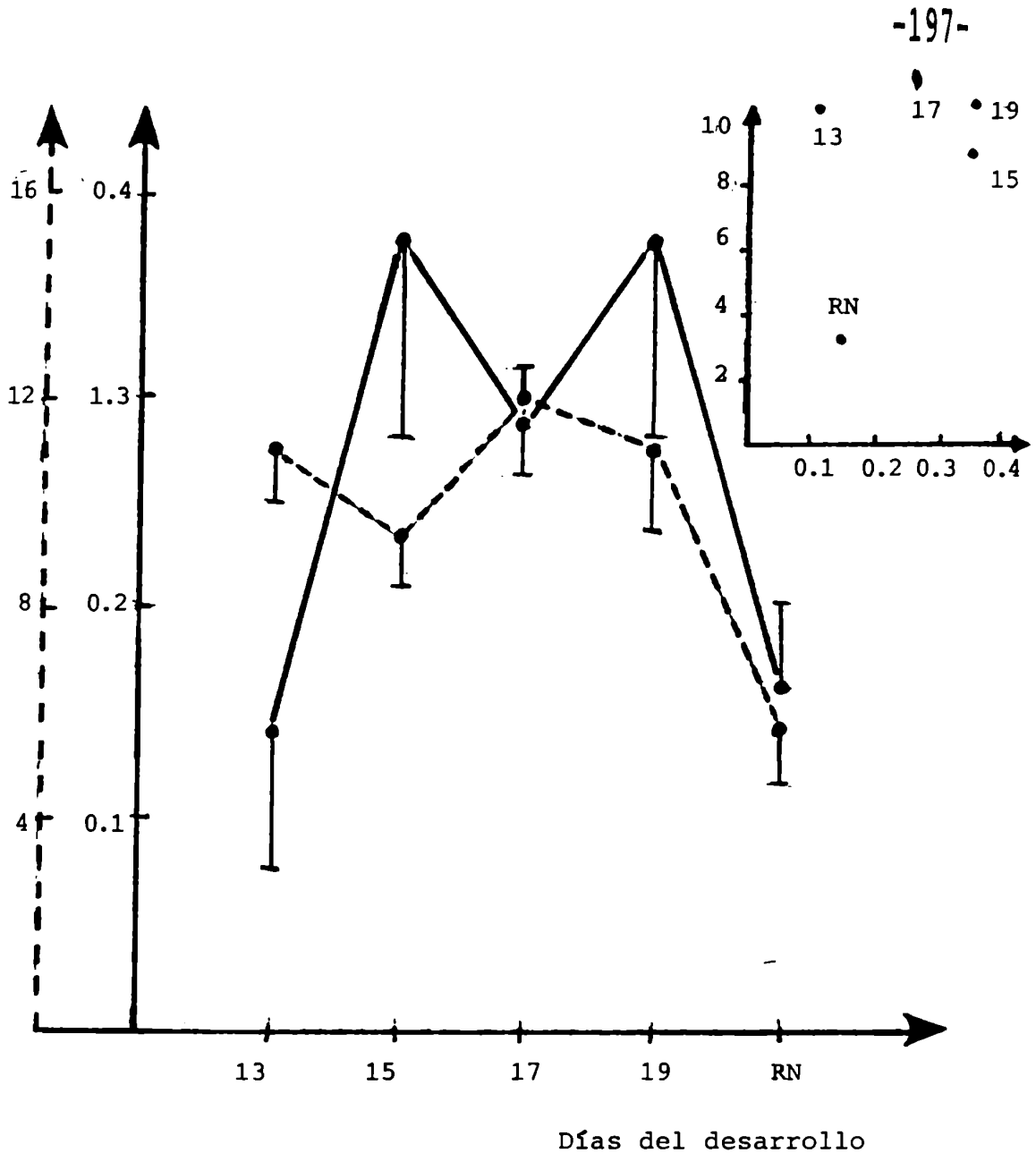

figura n°39: δ-Ala-S/10 mg tejido (—) y 5β-P/10 mg tejido (---) en ovario derecho de embrión durante el desarrollo..

Cuadro superior: Relación 5β-P/10 mg tejido a δ-Ala-S/10 mg tejido en cada estadío del desarrollo.

adrenal esta relación absoluta es buena entre los días 13 y 17 mientras que no existe dicha correlación en el ovario derecho. (fig. n°37, 38, 39).

F) INHIBICION FARMACOLOGICA Y RESTITUCION DE LA ACTIVIDAD DE δ-ALA-S EN LA ADRENAL

1. Los inhibidores no inhiben la actividad de δ-Ala-S en hígado.

2. Sin embargo los inhibidores de la esteroidogénesis, individualmente y aún más enconjunto, disminuyen la producción de Progesterona por tejidos esteroidogénicos y por ende la de sus metabolitos reducidos.

3. La presencia de CNK y SPNL individualmente y en conjunto, disminuyen la actividad de la δ-Ala-S en estos tejidos.

4. La 5β-pregnanodiona aumenta los niveles de δ-Ala-S en tejidos esteroidogénicos no inhibidos, por encima de los niveles fisiológicos.

5. La 5β-pregnanodiona restituye los niveles de actividad de δ-Ala-S, en estos tejidos, disminuidos como consecuencia de la inhibición de la esteroidogénesis.

DISCUSION

De acuerdo con la Introducción General de esta tesis,hemos investigado si se cumplen las propuestas para un eje regulatorio...

Hipófisis
↓
Hormonas hipofisarias
↓
Progesterona
↓
5β -reducidos
↓
δ-Ala-Sintetasa

Los hechos experimentales y su interpretación permiten afirmar al respecto lo siguiente:

Las series de experimentos 1 a 6 de la Introducción General, permiten concluir que existen ciertas semejanzas entre algunas curvas de desarrollo. Así:

a) LH y FSH en hipófisis (fig.N°17), guardan relación con Estradiol Sérico (Fig.N°20), ya que ambos ascienden hasta el día 17 acercándose luego a una meseta. La semejanzas de estas curvas se nota por simple comparación visual. Pero también las estadísticas muestrasn para LH que 13 es distinto de

15 y 15 de 17 y para FSH que 13 es distinto de 15 y 17 de 19. En el caso de Estradiol Sédico 13 y 15 son distintos de 17, 19 y 21 y cada población es homogénea.

b) Los valores promedios de LH sérica guardan semejanza con progesterona ovárica, exhibiendo ambas curvas un máximo en el día 19 (Fig.N°18 y 19). En efecto, las estadísticas muestran que los días 15 y 19 son máximos para LH sérica y el 19 lo es para el contenido endógeno de progesterona en ambos ovarios.

No sucede lo mismo con progesterona adrenal.

Por otra parte es de hacer notar que ni LH o FSH séricas se relacionan con progesterona sérica, y que LH de hipófisis no se relaciona con LH sérica.

Una explicación de estas semejanzas y diferencias,sobretodo de estas últimas, es especulativa. Sin embargo no es aventurado afirmar que los niveles séricos de progesterona no guardan semejanza con ninguna otra curva, ya que representan niveles de una hormona de rápido turnover, metabolizada en gran medida a metabolitos activos e inactivos (234).

En cambio los contenidos ováricos de progesterona representan con mayor fidelidad a la biosíntesis de esta hormona por un tejido progestacional y reflejan la respuesta directa de ésta a la estimulación por LH circulante.

La cantidad de información que poseemos, a través de esta

tesis, sobre FSH y estrógenos es más limitada, tanto por motivos técnicos como por tratarse de información accesoria a un tema principal.

Aquí, sin embargo, niveles séricos de estradiol se corresponden con contenidos hipofisarios de FSH (y de LH).¿Podrán explicarse las semejanzas entre niveles séricos de estradiol e hipofisarios de FSH, admitiendo que ninguna de las dos hormonas tiene un turnover tan rápido como los de LH y progesterona? ¿O que quizás FSH hipofisaria, a diferencia de LH hipofisaria, se libera a medida que se sintetiza?

De todos modos la existencia del eslabón LH-progesterona (y LH-estradiol), se halla concluyentemente demostrada por los experimentos de estimulación directa de la fig.No.21, que describe la evolución ontogenética de dicha estimulación.

La respuesta obtenida en ambos ovarios frente a la estimulación por gonadotrofinas, son coincidentes con los hechos observados por Woods y Weeks (125), de acuerdo con las cuales la regulación de la síntesis de progesterona y estradiol por estas trofinas hipofisarias comienza a partir del día 13 del desarrollo y se hace más importante a medida que nos acercamos al nacimiento.

Previo a este día 13 la síntesis hormonal es autónoma.

Otros hechos notables que se infieren de la observación de estas curvas, pero que no hacen a la existencia de los ejes; son:

La respuesta de síntesis de estradiol en ambos ovarios a

la estimulación gonadotrófica, es importante en el día 13 (fig. 21).Luego disminuye drásticamente en el ovario derecho, pero se mantiene a niveles relativamente altos en el ovario izquierdo.

Esto es una prueba más a favor de la indiferenciación (y funcionalidad) temprana de ambos ovarios y de la paulatina atrofia -también funcional- del desarrollo.

El rápido incremento del perfil de estradiol sérico desde el día 13 hasta el nacimiento obtenido en esta tesis, se correlaciona con: la síntesis bifásica de estradiol en el ovario izquierdo (días 6,5 - 12,5 y 13,5 - 18,5). (24); el crecimiento bifásico del conducto de Müller izquierdo (días 8-12 y 14-18) (223), y el aumento del número de receptores nucleares para estradiol en el conducto de Müller izquierdo (224).

Todos estos parámetros presentan una curva que a partir del día 13 asciende rápidamente hacia el nacimiento.

Estos resultados son entonces consistentes con la teoría de Groenendijk-Huijbers (225), en la que se postula que en el embrión de pollo hembra el crecimiento y diferenciación del conducto de Müller izquierdo es estrógeno-dependiente.

En el día 19 del desarrollo se observa máxima actividad de síntesis y secreción, e importante estimulación. Estos hechos coinciden con eventos metabólicos y de comportamiento observados en la literatura (222).

En cuanto a la síntesis de progesterona en tejidos embrio-

narios, máxima en el día 19, podríamos asociarla a una serie de efectos demostrados en el pollo, tales como: la inducción de avidina en oviducto estimulado con estrógenos (226,227); la modulación de la síntesis de RNAm de la ovoalbúmina (228); la inhibición de los receptores de estrógenos y de la actividad del DNA inducido por estrógenos en el oviducto (229); así como la inhibición de la actividad ornitina decarboxilasa inducida por estrógenos (23).

No podemos predecir si alguno de estos eventos, u otros, están asociados al pico de progesterona ovárica en el día 19 del desarrollo embrionario. Más aún, este máximo en la rudimentaria gonada derecha es llamativo; no hay en ella indicios de otro hecho de estas características.

Por el contrario, la glándula adrenal no posee dicho máximo en el día 19 y sus niveles, si bien son variables, no ascienden a valores destacables.

La serie de experimentos 8 y 9 de la Introducción General muestran las semejanzas en ovario izquierdo y adrenal, es decir en las glándulas esteroidogénicas funcionantes, en cuanto a las curvas de desarrollo correspondientes a la 5β-reductasa y a la δ-Ala-Sintetasa.

Se observa en ovario izquierdo que existe una relación entre las dos curvas (fig. No.38), ya que ambas tienden a decre

cer hacia el nacimiento.

Sin embargo, esta relación no es lineal, mientras que la reductasa disminuye 6 veces su valor desde el día 13 hasta el nacimiento, los niveles de sintetasa descienden sólo a la mitad.

Estas similitudes pueden ser compatibles con la hipótesis, segun la cual la 5β -pregnanodiona formada en el ovario izquierdo, tendría el rol -entre otros- de inducir la δ -Ala-Sintetasa en este tejido.

La falta de linearidad entre el inductor y los niveles enzimáticos, no está necesariamente en desacuerdo con esta hipótesis.

En efecto, otros autores ya han demostrado antes la acción inductora de 5β -Pregnanodiona, pero administrando el esteroide a altas concentraciones. Así, Kappas y col.(6), inyectaron 2,5-5,0 mg/por huevo hasta obtener un aumento de 50 veces la actividad de la enzima, y más recientemente Anderson y col.(199) obtuvieron un aumento de 3 veces con 10 mg de 5β -pregnanodiona.

En nuestros experimentos, los niveles de 5β -pregananodiona, calculados a partir de valores de conversión y contenido endógeno de progesterona (147) son por lo menos cuatro órdenes de magnitud menores que las concentraciones empleados por esos autores.

Existe también una correlación entre ambas curvas en las adrenales (fig.No.37). Estas son ondulatorias y poseen dos máximos. Uno de ellos está desfasado un estadío en la curva de δ -Ala-sintetasa, respecto de la 5β -pregnanodiona.

Aquí los niveles de reductasa descienden 10 veces desde el día 13 mientras que la actividad de la sintetasa desciende sólo a la mitad.

En este caso, como en el ovario izquierdo, 5β -pregnanodiona es muy baja en el nacimiento; aunque el descenso en la actividad de δ -Ala-sintetasa luego del último máximo es menos drástico.

Ni las diferencias observadas en la disminución de la actividad, ni el pequeño desfasaje del último máximo en la reductasa respecto del correspondiente en la sintetasa, están en desacuerdocon la hipótesis de la inducción.

Esta diferencia podría explicarse, en efecto, considerándola un desfasaje característico que se establece entre la acción del inductor (5β -P) y su expresión enzimática (δ -Ala).

Existe otra posibilidad: que el desfasaje de este máximo de actividad de δ -Ala-S se deba a una disponibilidad retardada del inductor en el sitio de biosíntesis de Ala.

Es interesant e el hecho que, ni el ovario derecho (no funcionante), ni el hígado exhiben esta relación (fig.No.39).

En las figuras Nos. 37,38 y 39, parte superior derecha, en las que se grafica 5β -reductasa vs δ -Ala-S, encontramos una relación lineal buena, entre los puntos correspondientes a cada uno de los estadíos estudiados, para el caso del ovario izquierdo; y cierta relación lineal entre los días 13 y 17 para la glándula adrenal. En cambio en el ovario derecho la distri-

bución es al azar.

De todos modos, y esto es lo más importante, aquí también se ha demostrado en forma concluyente el papel fisiológico que en la estimulación de δ-Ala-Sintetasa tiene 5β-Pregnanodiona mediante un experimento clásico en fisiología: la supresión farmacológica de la esteroidogénesis en adrenal, con lo cual se reduce en un 30% la δ-Ala. Luego el reemplazo de la esteroidogénesis por cantidades estimadas fisiológicas de 5β-Pregnanodiona, con lo cual se pudo reestablecer las actividades controles de δ-Ala-S de preparados no suprimidos.

Esta es la primera vez que se utilizan concentraciones pequeñas de un 5β-reducido y un tejido esteroidogénico, para mostrar el efecto estimulador de estos sobre la δ-Ala-S y también la primera vez que este efecto se simula en un modelo suprimido.

Otros hechos notables que se infieren de la observación de estas curvas pero que no hacen a la existencia de los ejes; son:

En los estadíos más tempranos estudiados, tanto las adrenales embrionarias como los ovarios poseen una importante actividad reductásica, del orden de la hallada en los días 17 y 19 del desarrollo (fig.No.28 y 29).

Parson en 1970 (15), encontró actividad 5β-reductásica ya en el período blastodérmico del pollo. Irving y col. (162),

fueron los primeros en prestar atención a la importancia de estos hallazgos en la inducción de la síntesis de hemoglobina embrionaria.

Por otro lado, hemos detectado por lo menos 10 metabolitos en la adrenal de embrión de pollo, entre los que se encuentran los corticoides clásicos de esta glándula (fig.No.27).Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Nakamura y col.(92), Idler y col.(231) y Kalliecharan y Hall (157).

El principal corticoide sintetizado a partir de ^{3}H-progesterona fué ^{3}H-Corticosterona;su biosíntesis fué utilizada como standard para evaluar la actividad reductiva en este mismo tejido.

Los resultados observados sugieren que la 5β-reductasa en adrenal, compite eficientemente por la progesterona con las enzimas del camino de la corticosterona en el día 13 y 15,pero esa competencia disminuye a medida que se aproxima el nacimiento. Vemos en la fig. No.28 A y B, un perfil simétrico de las curvas 5β-pregnanodiona-corticosterona y el descenso exponencial de la curva 5β-P/B.

Algo similar ocurre en el ovario izquierdo (fis.No.29A). Este órgano, en el estadío más temprano estudiado, es un productor de 5β-pregnanodiona más potente aún que las adrenales.

Este esteroide es el metabolito más significativo en el día 13 en la gonada izquierda.

En los estadíos posteriores esta actividad desciende drás-

ticamente, mientras que la actividad 5α-reductásica desciende comparativamente menos.

Las diferencias con el ovario derecho consisten en la pequeña proporción de 5β-P en el día 13 y en el distinto perfil de las funciones relativas a las curvas 5α-P/5β-P a lo largo del desarrollo.

Estas diferencias podrían no ser sorprendentes, si consideramos la asimetría funcional (Witschi 1935 , 85);(Van Limborgh 1968, 214) (Gasc 1975, 22), morfológica (Dantchakoff y Guelin-Shedrina 1932, 83) y bioquímica (Gasc 1975, 22) en el desarrollo de las gonadas femeninas en las aves. (Ver también Introducción).

Habíamos comentado el rápido descenso de la actividad 5β-reductásica durante el desarrollo en la adrenal y en el ovario izquierdo (funcional).

Más aún esta última glándula exhibe un incremento, durante el desarrollo, en la relación 5α-P/5β-P (fig.No.29B).

Estos hallazgos en un tejido funcional endócrino, estarían de acuerdo con los conceptos de Bottoni y Massa (232) respecto de la existencia de un "Shunt" de inactivación relacionado con la 5β-reductasa.

Estos autores hablan en sus trabajos, de una actividad reductásica neuroendócrina en aves, donde postulan que la 5β-reducción predomina en el período temprano en los tejidos esteroidogénicos en vertebrados, mientras que la 5α-reducción se

transforma gradualmente en importante -en estos tejidos- a medida que progresa el desarrollo. (Lantos 1981, 233).

Insisto en el experimento de inhibición farmacológica de la esteroidogénesis con supresión de la actividad de la δ-Ala-S y posterior restitución de esta última actividad mediante el agregado de cantidades fisiológicas de 5β-P exógena.Este experimento habla a favor de la regulación de la δ-Ala-S por dicho metabolito.

Dado que 5β-P es producido por la célula endócrina y que la inducción de δ-Ala-S tiene lugar en esta misma célula, podríamos postular aquí un mecanismo de regulación autócrina. Es bien sabido que la síntesis de δ-Ala es el primer paso -y paso limitante- de la porfirinogénesis; por consiguiente esta regulación autócrina podría corresponder, a una regulación de las porfirinas producidas por la célula esteroidogénica por una hormona sintetizada en la misma célula. Cualquier hipótesis en cuanto a la naturaleza de las porfirinas inducidas es aún aventurada. Sin embargo no debemos olvidar que los citocromos, incluyendo el C_3 y el P_{450} -este último interviniente directo en las hidroxilaciones de los esteroides- son porfirinas, y por ende, limitadas por el paso de la síntesis de δ-Ala y -como aquí se demuestra- modulados por los 5β-reducidos.

También debemos tener presente la estructura A/B cis de la 5β-pregnanodiona. Muchos compuestos que poseen dicha conformación ejercen efectos hormonales muy tempranos y en eslabones primarios de la escala evolutiva. Tal es el caso de la ecdisona, cuya conformación es también A/B cis.

Si tenemos en cuenta que la 5β-reducción ya aparece en el blastodermo del embrión de pollo (ver Introducción,15),podríamos estar, tanto en uno como en otro caso, ante verdaderas protohormonas del reino animal.

CONCLUSIONES GENERALES

Arribamos a través de esta tesis, a las siguientes conclusiones:

1.) Los parámetros hormonales estudiados mostraron que:

a) LH y FSH hipofisarios aumentan ininterrumpidamente hacia el nacimiento.

b) LH sérica presenta dos máximos en los días 15 y 19 del desarrollo.

c) Progesterona endógena en ambos ovarios presenta un máximo muy importante en el día 19 del desarrollo.

d) La concentración sérica de progesterona es aproximadamente constante y la de estradiol sérico aumenta a medida que se aproxima el nacimiento.

2.) Se encontraron similitudes entre las siguientes curvas ontogenéticas:

a) LH y FSH hipofisarias guardan relación con estradiol sérico, ya que ambos ascienden hasta el día 17 y luego se aproximan a una meseta.

b) Los valores de LH sérica se asemejan a los de progesterona ovárica, exhibiendo ambos curvas un máximo en el día 19.

3.) En experimentos directos, LH estimula la síntesis de progesterona y estradiol, observándose que la respuesta de estra-

diol en ambos ovarios es alta en el día 13; para el ovario derecho disminuye hacia el nacimiento y para el ovario izquiero disminuye hacia el día 17 y se recupera en el nacimiento.

La respuesta de progesterona en ambos ovarios aumenta hacia el nacimiento, y es menor que para el estradiol.

4.) La 5β-reductasa ovárica muestra valores altos en el estadio más temprano estudiado y disminuye hacia el nacimiento.

5.) La 5α-reductasa ovárica también disminuye hacia el nacimiento, aunque más lentamente y sus valores son un orden de magnitud menor que la 5β-reducción.

6.) La δ-Ala-S en ovario izquierdo disminuye hacia el nacimiento; en adrenal se observan dos máximos relativos en los días 13 y 19, y en el ovario derecho se observan dos máximos en el día 15 y 19.

7.) La δ-Ala-Sintétasa muestra semejanzas con la 5β-reductasa, sólo en ovario izquierdo y adrenal.

8.) En adrenal se observa un perfil simétrico entre corticoidogénesis y 5β-reductasa. Así, la 5β-reducción disminuye desde el día 13 hacia el nacimiento y la actividad corticoidogénica aumenta hacia el nacimiento. La progesterona endógena no ofrece características muy salientes.

9.) La supresión farmacológica de la esteroidogénesis mediante el empleo "in vitro" de CNK y SPNL, disminuye también en

un 30% la actividad de la δ -Ala-Sintetasa en adrenal.

10) El agregado de 5β -P (10^{-7}M) exógeno a este modelo suprimido restituye totalmente la actividad de δ-Ala-S en este mismo tejido.

R E F E R E N C I A S

1.- JAMES, R. and BRADSHAN, R Ann. Rev. Biochem. 53, 259-292 (1984).

2.- SELYE, H. en "Perspectives in Biology y Medicine" pp. 343-362, Spring (1970).

3.- GUYRR, P.M.; BODWELL, J. E. y MUNCK,A. en Hormones and Cancer. Ediciones E. Gurpide, R. Calandra, C. Levy y R.J. Soto. Alan, R. LISS, INC, New York. Press. 1984.

4.- ANDERSON, K.A.; BRODLOW, H.L.; SASSA, S. y KAPPAS, A. Am. J. Med. 66, 644-650 (1979).

5.- PFAFFENBERGER, C.D.; HORNING, E.C. Anal. Biochem 88, 689-694 (1978).

6.- KAPPAS, A.; SONG CHULL, S.; LEVERE, R.D.; SACHSON, R. A. y GRANICK, S. P.N.A.S. 61(2), 509-513 (1968).

7.- ZUYDERHOUDT, F.M.; BORST, P. y HUIJING, F. Biochem. Biophys. Acta 178, 408-411 (1969).

8.- AOKI, Y.; WADA, O.; URATA, G.; TAKAKU, F.: y NAKAO,K. Biochem et Biophys- Research, Communication 42(3),568-575 (1971).

9.- NECHELES, T.F. y RAI, V.S. Blood. 34(3), 380-384 (1969).

10.- GRANICK, S. y KAPPAS, A. J. Biol. Chem. 242, 4587-4593 (1967).

11.- YOUNG, J.Z. en "La vida de los vertebrados" pp.420-421. Ediciones Omega, barcelona. España (1971).

12.- ADES, I.Z. y HARPE, K.G. J. Biolog. Chem. 251, 1340-1346. (1976).

13.- WILLER, B.H. Physiol. Zool. 3, 201-225 (1930).

14.- DOMM, L.U. y ERICSON, G.C. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140, 1215-1220 (1972).

15.- PARSON, I.C. Steroids. 16, 59-65 (1970).

16.- WOODS, J.E. y ERTON, L.H. Gen. Comp. Endocrinol. 36, 360-370 (1978).

17.- PEDERNERA, E.A. J. Embriol. Exp. Morph. 25, 213-222. (1971).

18.- WOODS, J.E.; MENNELLA, J.A. y THOMES, R.C. Gen. Comp. Endocrinol. 45,66-73. (1981).

19.- FRIEDMAN, B.J. Morphol. 55, 611-631 (1934).

20.- WOODS, J.E. y PODCZASKI, E.S. Gem. Comp. Endocrinol. 24, 413-423 (1974).

21.- STOLL, R. y MARAUD, L. en "Embryologie, Chimiquie et Experimentale. Livre. Jubilaire offert a E. Wolff.pp. 202. Ediciones Masson y Cia. Paris. 1975.

22.- GASC, J.M. en "Embryologie, Chimiquie et Experimentale" Livre Jubilaire offert a E. Wolff. pp.229-238 Ediciones Masson y Cia. Paris. Francia (1975).

23.- SCHEIB, D. Ann Histochimie. 4, 33-50 (1959).

24.- WOODS, J.E. y BRAZZILL, D.M. Gen.Comp. Endocrinol.44, 37-43 (1981).

25.- WOODS, J.E.; DEVRIES, G.W. y THOMMES, R.C. Gen Comp. Endocrinol. 17, 407-415 (1971).

26.- SPRATT, N.T. J. Exptl. Zool. 106, 345-366 (1947c).

27.- SPRATT, N.T. J. Exptl. Zool. 107, 39-64 (1948).

28.- NEEDHAM, J. Physiol. Rev. 5, 1-62 (1925).

29.- HOFFMANN, G. y VOLKER, H. en "Anatomía y Fisiología de las Aves Domésticas". Ediciones Acribia. Barcelona. España (1968).

30.- ROMANOFF, A.L. en "The Avian Embryo: Structural and Functional Development" p.890 Ediciones The Macmillan Co. New York E.E.U.U.(1960).

31.- WINGSTRAND, K.G. en"Avian Biology" III. p.110. Ediciones Farner-King Parkcs. Academic Press. (1973).

32.- DRAGER, G.A. Endocrinology. 36(107), 124-129 (1945).

33.- VENZKE, W.G. en "The Avian Embryo: Structural and Functional. Development" p.893.Ediciones The Macmillan Co. New York. E.E.U.U. (1960).

34.- ATWELL, W.J. Anat. Record. 73, 57-71 (1939).

35.- ECONOMO, C.J. en "The Avian Embryo: Structural and Functional Development".p.895. Ediciones The Macmillan Co. New York. E.E.U.U.(1960).

36.- WILSON, M.E. Poultry Sci. 27, 719-726 (1948).

37.- MOSCONA, H. y MOSCONA, A. J. Anàt. 86,278-286 (1952).

38.- DAWSON, A.B. Anat. Record. 97, 413-(1947).

39.- WILSON, M.E. Anat. Record. 103, 521-522 (1949).

40.- WOODS, J.E.; SIMPSON, R.M. y MOORE, P.L. Gen.Comp. Endocrinol. 27, 543-547 (1975).

41.- TIXIER-VIDAL, A. y FOLLET, B.K. en "Avian Biology" III p. 114. Ediciones Farner-King Parkcs. Academic Press. (1973).

42.- FRAPS, R.M.; FEVOLD, H.L. y NEHER, B.H. Anat. Record. 99, 471-572. (1947).

43.- STOCKELL HARTREE, A. y CUNNIGHAM, F.J. J. Endocrinol. 43, 609-616 (1969).

44.- PARLOW, A.F. en "Human Pituitary Gonadotrophins". p. 300. Ediciones Albert, A. Springfield. Illinois (1961).

45.- STEELMAN, S. y PHOLEY, F.H. Endocrinology. 53, 604-616. (1953).

46.- BRENEMAN, W.R.; ZELLER, F.J. y BEEKMAN, R.E. Poultry Sci. 38, 152-158. (1959).

47.- BAGSHAWE, K.D.; ORR, A.H. y GOODDEN, J. J. Endocrinology 42, 513-518. (1968).

48.- GOLDMITH, A.R. y FOLLET, B.K. Gen. Comp. Endocrinol. 50, 24-35. (1983).

49.- VAN TIENHOVEN, A. en "Sex and Internal Secretion" II pp.1088-1169. Ediciones Wic Young. Baltimore (1961).

50.- NALBANDOV, A.V. en "The Pituitary Gland" I. p.295. Ediciones Harris and Donovan. Londres. (1966).

51.- MITCHEL, M.E. J. Reprod. Fert. 14, 249-256. (1961).

52.- VAN TIENHOVEN, A.; NALBANDOV, A.V. y MORTON, H.W. Endocrinology 54, 605-611.(1954).

53.- MIKAMI, S. VITUMS, A. y FARNER, D.S. en "The Avian Embryo: Structural and Functional Development"p.901 Edicionesthe Macmillan Co. New York,E.E.U.U.(1960).

54.- SCANES, C.K. y FOLLET, B.K. British Poultry Sci.13, 603-610. (1972).

55.- RIDDLE, O. J.Nat. Cancer. Inst. 31,1039-1110 (1963).

56.- SALEM, M.H.M.; NORTON, H.W. y NALBANDOV, A.V. Gen.Comp. Endocrinol.14,281-289. (1970b).

57.- TOUGARD, C. en "Avian Biology" III. p. 169. Ediciones Farner-King Parkcs. Academic Press. (1973).

58.- SOLOMON, J. y GREEP, R.O. Endocrinology. 65,334-335. (1959).

59.- MONDGAL, N.R. y LI, C.H. Arch. Biochem. Biophys. 93, 122-127. (1961b).

60.- NALBANDOV, A.V. y JAMES, M.F. Am. J. Anat. 85, 347-377. (1949).

61.- HUTT, F.B. en "Genetics of the Fowl" p. 283. Ediciones Mc Graw-Hill. New York. E.E.U.U. (1949).

62.- VAN TIENHOVEN, A. en "Reproductions in Domestic Animals" II. pp.305-342. Ediciones Coles y Crepps. Academic Press. New York. (1959).

63.- MARSHALL, A.J. y COOMBS, C.J.F. Proc. Zool. Soc. London. 132, 617-625. (1959).

64.- BRODE, M. J. Morphol. 46, 1-57. (1928).

65.- CEDARD, L. y HAFFEN, K. C.R. Acad. Sci. 263, 430- (1966).

66.- WENIGER, J.P. y ZEIS, A. C.R. Acad. Sci. 268, 1306- (1969).

67.- FURR, B.J.A. Gen. Comp. Endocrinol. 13, Abstr. 56. (1969a.).

68.- FURR, B.J.A. Gen. Comp. Endocrinol. 13, Abstr. 57 (1969b).

69.- HÖHN, E.O. y CHENG, S.C. Gen. Comp. Endocrinol.8,1-11 (1967).

70.- LAYNE, D.S.; COMMON, R.W.; MAW, W.A. y FRAPS, R.M. Nature. 181, 351-352. (1958).

71.- O'GRADY, J.E. Biochem, J. 106, 77-86 (1968).

72.- O'MALLEY, B.W.; KIRCHNER, M.A. y BARDINI, C.W. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127, 521-523. (1968).

73.- SAYLER, A.; DOWD, A.J. y WOLFSON, A. Gen. Comp. Endocrinol.15,20-30. (1970).

74.- WOODS, J.E. y DOMM, L.V. Gen. Comp. Endocrinol. 7, 559-570 (1966).

75.- NARBAITZ, R. y de ROBERTS, J.M. Histochimie. 15,187-193 (1968).

76.- CHIEFFI, G. y BOTLE, V. Experientia. 21,16-17 (1965).

77.- BOUCEK, R.J. y SAVARD, K. Gen. Comp. Endocrinol. 15, 6-11 (1970).

78.- SWIFT, C.H. Am. J. Anat. 20, 375-410 (1916).

79.- FUGO, N.W. J. Exp. Zool. 85, 271-297 (1940).

80.- WOLFF, E. y STOLL, R. C.R. Soc. Biol. 126, 1215-1217 (1937).

81.- BRENEMAN, W.R. Anat. Record. 64, 211-220 (1936).

82.- SMITH, P.E. y ENGLE, E.T. Am. J. Anat.40,159-217(1927).

83.- DANTCHAKOFF, V. y GUELIN-SHEDRINA, A. C.R.Séanc.Soc. Biol. 109, 857-(1932).

84.- SWIFT, C.H. Am. J. Anat. 18, 441-447 (1915).

85.- WITSCHI, E. Am. J. Anat. 56, 119-141(1935).

86.- TESTUT, L. y LATARJET, A. en "Tratado de Anatomía Humana". III. p.1159. Ediciones SALVAT. Barcelona. España. (1949).

87.- HAYS, V.J. Anat. Record. 8,451-474(1914).

88.- KONDICS, B. y KJAERHEIM, M. en "Avian Biology" p.187 Ediciones Farner-King Parcks Academic Press. (1973).

89.- FUJITA, H. y MACHINO, M. en "Avian Biology" III p.187 Ediciones Farner-King Parkcs. Academic Press (1973).

90.- KANO, M. en "Avian Biology" III p.187 Ediciones. Farner-King Parcks. Academic Press (1973).

91.- SANDOR, T. y LAUTHIER, A. Biochim. et Biophys. Acta 74, 756-762 (1963).

92.- NAKAMURA, T.; TANABE, Y. y HIRANO, H. Gen. Comp. Endocrinol. 35,302-308 (1978).

93.- BRONN, K.I.; BROWN, D.J. y MEYER, R.K. Amer. J.Physiol. 192, 43-(1958a).

94.- MACCHI, I.A.; PHILLIPS, J.G. y BROWN, P. J. Endocrinol. 38,319-329 (1967).

95.- KONDICS, B. en "Avian Biology" III p. 187. Ediciones Farner-King Parcks. Academic Press (1973).

96.- PECZELY, P. Acta. Biol. Acad. Sci. Hungar. 15,171-179 (1964).

97.- SHEPHERD, D.M. y WEST, G.B. Brit. J. Pharmacol. Chem. Ther 6,665-674. (1951).

98.- CUELLO, A.C. Experientia. 26, 416-418 (1970).

99.- FRANKEL, I.A.; COOK, B.; GRABER, J.W. y NALBANDOV, A.V. Endocrinology 80,181-194 (1967).

100.- TORRES, H.N. y CHARREAU, E.H. en "Endocrinología Molecular". pp.7-22. Ediciones "El Ateneo" Argentina. (1980).

101.- TANABE, Y.; NAKAMURA, T.; FUJIUKA, K. y DOI, O. Gen. Comp.Endocrinol. 39,26-33 (1979).

102.- DIETSCHY, J.M. y Mc Garry, J.D. J. Biology. Chem. 249, 52-58 (1974).

103.- HUANG, E.S-R.; KAO,K.T. y NALBANDOV, A.B.Biol.Reprod. 20,454-461 (1979).

104.- ETCHES, R.J. y CHENG, K.W. J. Endocrinol. 91,11-22 (1981).

105.- TANABE, Y.; OGAWA, T. y NAKAMURA, T. Gen. Comp. Endocrinol. 43,392-398 (1981).

106.- KAMIYOSHI, M. y TANAKA, K. Poultry Sci. 48,2025-2032 (1969).

107.- IMAI, K. y NALBANDOV, A.V. Endocrinology. 88,1465-1470 (1971).

108.- ETCHES, R.J. y WINNINGHAM, F.J. Acta. Endocrinológica. 84, 357-366 (1977).

109.- HAMMOND, R.W.; TOOD, H. y HERTENLENDY, F. I.R.C.S. Med. Sci. 6,452-456 (1980).

110.- HERTENLENDY, F. y HAMMOND, R.W. Biol. Reprod. 23, 918-923 (1980).

111.- SCANES, C.G. y FAGIOLI, J.H. Gen. Comp. Endocrinol. 41, 1-7(1980).

112.- HAMMOND, R.W.; TOOD, H. y HERTENLENDY, F. Gen. Comp. Endocrinol. 41, 467-476 (1980).

113.- TENG, C.T.; TENG, C.S.; BOUSFIELD, G.R.; LIU, W.K. y WARD, D.N. Gen. Comp. Endocrinol. 48, 325-332 (1982).

114.- GUICHARD, A.; CEDARD, L. y HAFFEN, K. Gen. Comp. Endocrinol. 20,16-28 (1073).

115.- GALLI, F. y WASSEMAN, P. Gen. Comp. Endocrinol. 19, 509-514 (1972).

116.- GUICHARD, A.; CEDARD, L.; MIGNOT, Th-M.; SCHEIB, D. y HAFFEN, K. Gen. Comp. Endocrinol. 32, 255-265. (1977a).

117,- OZON, R. Gen. Comp. Endocrinol. Suppl. 2,135-140 (1969).

118.- GUICHARD, A.; HAFFEN, K.; CEDARD, L.; MIGNOT, Th-M. y SCHEIB, D. Am. Biol.Anim. Bioch. Biophys. 19(413), 1317-1325 (1979).

119.- NARBAITZ, R. y ADLER, R. Experientia. 22, 677-683 (1966).

120.- WELLS, J.W.; DICK, H.R. y GILBERT, A.B. J. Steroid. Biochem. 14,651-656 (1981).

121.- TENG, C.T. y TENG, C.S. Endocrinology 104(5), 1137-1343 (1979).

122.- TENG,C.T. y TENG,C.S. Biochem.J.162,123-134 (1977).

123.- HAFFEN, K. y CEDARD, L. Gen. Comp. Endocrinol. 11, 220-234 (1968).

124.- CEDARD, L; HAFFEN, K. y GUICHARD, A. C.R. Acad. Sci. Paris. Ser. D. 267, 118-120 (1968).

125.- WOODS, J.E. y WEEKS, R.L. Gen. Comp. Endocrinol. 13, 242-254 (1969).-

126.- VOGEL, N.W. Anat. Record. 127, 382-386 (1957).

127.- WOODS, J.E.; PODCZASKI, E.S.; ERTON, L.H.; RUTHERFORD, J.E. y Mc CARTER, C.G. Gen. Comp. Endocrinol. 32, 390-394 (1977).

128.- WOODS,J.E. y RUTHERFORD, J.E. Amer. Zool. 17(4), 229-235 (1977).

129.- EDE, D.A. en "Anatomía de las Aves" pp. 122-125. Ediciones Acribia. Zaragoza. España (1965).

130.- SCANES, C.G.; GODDEN, P.M.M. y SHARP, P.J. J.Endocrinol. 73, 473-481 (1977).

131.- GOODEN, P.M.M. y SCANES, C.G. Gen. Comp. Endocrinol. 27, 538-542 (1975).

132.- GREENWOOD, F.C.; HUNTER, W.M. y GLOVER, J.S. Biochem. J. 89, 114-123 (1963).

133.- FOLLET, B.K.; SCANES, C.G. y CUNNINGHAM, F.J. J. Endocrinolog. 52, 359-378 (1972).

134.- BATES, R.W.; GARRISON, M.M.; COOPER, J.A. y CONDLIFFE P.G. Endocrinology 83, 721-730 (1968).

135.- SOKAL, R.R. y ROHLF, en " Biometry: The principles and Practice of Statistics in Biological Research". pp 198-252. Ediciones Freeman, and Co. San Francisco E.E.U.U. (1980).

136.- STOLINE, M.R. The American Statistician 35(3), 134-141 (1981).

137.- COZZA, E.N.; GONZALEZ, C.B.; CEBALLOS, N.R.; ARAGONES A.; LENZA, R. y LANTOS, C.P. Anales Asoc. Quím.Argentina. 71. 509-521 (1983).

138.- SCHONESHOFER, H.J.; FASTER, C. y FENNER, A. Fresenius Z. Anal. Chem. 301, 130-136 (1980).

139.- HEFTMAN, E. y HUNTER, I.R. J. Chromatog. 165, 283-287 (1979).

140.- KNOX, J.H. y PRIJDE, A. J. Chromatog. 112,171-175 (1975).

141.- WIKBY, A.; THALEN, O. y ORESTEN, G. J. Chromatog. 157, 65-69 (1978).

142.- MORRIS, D.J. y TSAI, R. en "Advance in Chromatography" Vol. 19, p.481. J.C. Giddings Ediciones (1980).

143.- BALLEMIR, R.; CHINOL, M. y GHELARDONI, M. J. Cromatog. 193, 413-417 (1980).

144.- ZAFFARONI, L. y BURTON, R. J. Biol. Chem. 193, 749-753 (1951).

145.- BUSH, I.E. Biochem. J. 150, 370-376 (1952).

146.- SOLVENT, USE, INDEX I (catálogo) 83, 194-D74,WATERS Associates (MIDFORD; MASS, USA).

147.- GONZALEZ,C.B.; COZZA, E.N.; BEDNERS, M.L.O.; LANTOS, C.P. y ARAGONES, A. Gen. Comp. Endocrinol. 51, 384-393 (1983).

148.- ABRAHAM, G.E.; SWERDLOFF, R.: TULCHINSKY, D.A.N. y ODELL, W.D.J.Clim. Endocrinol. Metab. 32, 619-624 (1971).

149.- ABRAHAM, G.E. en "Methods of Hormone Analysis" pp. 408-415. Ediciones Btever y otros. Georgthieme Verlab. Stuttgart.

150.- ABRAHAM, G.E. J.Clin Endocrinol. Metab. 29, 866-870 (1969).

151.- SANDOR, T.; LAMOUREUX, J. y LANTHIER, A. Bioch.Bioph Acta 74, 756-762 (1963).

152.- URIST, M.R. y DEUTSCH, N.M. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104, 35-39 (1960).

153.- SANDOR, T. Gen. Comp. Endocrinol. Suppl. 2, 284-287 (1069).

154.- WHITEHOUSE, B.J. and Vimson, G.P. Gen. Comp. Endocrinol. 9, 161-170 (1967).

155.- DONALDSON, E.M.; HOLMES, W.N. y STACHENKO, J.G. Gen. Comp. Endocrinol. 5, 542-548 (1965).

156.- DE ROOS, R. Gen. Comp. Endocrinol. 1,494-512 (1961).

157.- KALLIECHARAN, R. y HALL, B.K. Gen. Comp. Endocrinol. 30, 404-409 (1976).

158.- GUICHARD, A.; CEDARD, L.; MIGNOT, Th-M.; SCHEIB, D. y HAFFEN, K. Gen. Comp. Endocrinol. 39, 9-19 (1979).

159.- LANTOS, C.P.; RAMAN, P.B.; GRAVES, J.M.H.; DORFMAN, R.I. y FORCHIELLI, E. Steroids. 6:1, 69-79 (1965).

160.- PEDERNERA, E.A. y LANTOS, C.P. Gen. Comp. Endocrinol 20, 331-341 (1973).

161.- KAHN, C.R.; NEVILLE, D.M. Jr. y Roth, J. J. Biol.

Chem. 248, 244-250 (1973).

162.- IRVING, R.A.; MAINWARING, I.P. y SPOONER, P.M. Biochem. J. 154, 81-93 (1976).

163.- URABE, A.; SASSA, S. y KAPPAS, A. J. Exp. Med. 149, 1314-1325 (1979).

164.- GRANICK, S. Proc. Nat. Acad. Sci. 61, 509-513(1968).

165.- WELLS, J.W. Comp. Biochem. Physol. 40A, 61-70(1971).

166.- CHEN, P.H. y COMMON, R.H. Can. J. Chem. 233, 331-335 (1969).

167.- LAATIKAINEN,T. y VIHKO, R. Steroids. 14, 119-131 (1969).

168.- MORGAN, M.D. y WILSON, J.D. J. Biol. Chem. 245,3781-3789 (1970).

169.- MASON, N.R. Endocrinology. 87, 350-355 (1970).

170.- INABA, T.; IMORI, T. y MATSUMOTO, K. J.Steroid.Biochem. 9, 1105-1110 (1978).

171.- KARAWA, L.; KURACHI, K.; AONO, T. y MATSUMOTO, K. Endocrinology. 98, 571-579 (1976).

172.- KRAUSE, T.E. y KARAVOLAS, H.J. J.Steroid. Biochem.13 271-280 (1980).

173.- KARAVOLAS, H.J.; HODGES, D.R.; O'BRIEN, D.J. y MACKENZIE, K.M. Endocrinology. 104(5), 1418-1425 (1979).

174.- ZANIZI, M. y MARTINI, L. J.Steroid. Biochem. 6, 1021-1023 (1975).

175.- ADES, I.Z. y HARPE, K.G. J.Biol. Chem. 256, 9329-9333 (1981).

176.- ADES, I.Z. y HARPE, K.G. Biochem. J. 205, 257-263 (1982).

177.- CONDIE, L.W.; BARON, J. y TEPHLY, T.R. Arch. Biochem. Biphys. 172, 123-129 (1976).

178.- BRIGGS, D.W.; CONDIE, L.W.; SEDMAN, R.M. y TEPHLY, T. R. J. Biol. Chem. 251, 4996-5001 (1976).

179.- BONKOWSKY, H.L.; COLLINS, A.; DOHERTY, J.M. y TSCHUDY, D.P. Biochem. Bioph. Acta. 320, 561-576 (1973).

180.- KIM, H.J. y KIKUCHI, G. Arch. Biochem. Bioph. 164, 293-304 (1974).

181.- GRANICK, S. y URATA, G. J.Biol.Chem.238,821-827 (1963).

182.- GRANICK, S. J. Biol. Chem. 241, 1359-1375 (1966).

183.- TEPHLY, T.R. y HIBREIN, P. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 586-596 (1971).

184.- MAINES, M.D. Biochem. J. 190, 315-321 (1980).

185.- TOFILON, P.J. y PIPER, W.N. Arch. Biochem. Biophys. 201, 104-109 (1980).

186.- EBERT, P.S.; TSCHUDY, D.P.; CHOUDHRY, J.N.y CHIRIGOS, M.A. Biochem. Biophys. Acta. 208, 236-242 (1970).

187.- BARNES, R.; JONES, M.S.; JONES, O.T.G. y PORRA, R.J. Biochem. J. 124, 633-638 (1971).

188.- YODA, B.; SCHATER, B.A. y ISRAELS, L.G. Biochem. Biophys. Acta. 372, 478-485 (1974).

189.- LIEN, L.F. y BRATTIE, D.S. Arch. Biochem. Biophys. 215, 171-178 (1982).

190.- SPOONER, P.M. y MAINWARING, W.I.P. Acta. Endocrinol. (Copenhagen) . 177, 181-188 (1973).

191.- MIZOGUCHI, H. y LEVERE, R.D. J. Exp. Med. 134, 1501-1512 (1971).

192.- PURVIS, J.; CANICK, J.; ROSEMBAUM, J.; HOLOGGITAS,J. y MENARD, R. Arch. Biochem. Biophys. 159, 32-38 (1973).

193.- PURVIS, J.; CANICK, J.; LATIF, S.; ROSEMBAUM, J. HOLOGGITAS, J. y MENARD, R. Arch. Biochem. Biophys. 159, 39-49 (1973).

194.- TSCHUDY, D.P.;PERLROTH, M.G.; MARVER, H.S.; COLLINS, A.; HUNTER, G. Jr. y RECHCIGL, M. Jr. Proc. Nat.Acad. Sci. 53, 841-847 (1965).

195.- NAKAO, K.; WADA, O.; KITAMURA, T.; UONO, K. y URATA, G. Nature. 210, 838-844 (1966).

196.- STRAND, L.J.; FELSHER, B.F.; REDEKER, A.G. y MARVER, H.S. Proc. NAt. Acad. Sci. 67, 1315-1320 (1970).

197.- Mc INTYRE, N.; PEARSON, A.J.G.; ALLAN, D.J.; CRASKE, S.; WEST, G.M.L.; MOORE, M.R.; BEATTIE, A.D.; PAXTAN, J. y GOLBERG, A. Lancet. 1, 560-566 (1971).

198.- ANDERSON, K.E.; ALVAREZ, A.P.; SASSA, S. y KAPPAS,A. Clin. Pharmacol. Ther. 19, 47-54 (1976).

199.- ANDERSON, K.E.; FREDDARA, U. y KAPPAS, A. Arch. Biochem. Biophys. 217(2), 597-608 (1982).

200.- KING, J. y MAINWARING, W.I.P.(1974) citado en Biochem J. 154, 81-93 (1976).

201.- BORTHWICK, I.A.; SRIVASTAVA, G.; BROOKER, J.D. MAY,B.K

y ELLIOT,W.H. Eur. J. Biochem. 129, 615-620 (1983).

202.- WHITING, M.J. y GRANICK, G. J. Biol. Chem. 251, 1340-1346 (1976).

203.- KLIMAN, B. y PETERSON, R.E. J. Biol. Chem. 235, 1639-1646 (1960).

204.- ARAGONES, A. GROS, E.G.; LANTOS, C.P. y LOCASCIO,G.A. J. Steroid. Biochem. 9, 175-180 (1978).

205.- BUSH, I.E. y WILLOUGH, B. Biochem. J. 67, 689-695 (1957).

206.- Packard Instrument Co., Technical Bulletin.

207.- DAVIDSON, J.D. y FEIGELSON, P.P. 2, 13-20 (1957) Int. J. Appl. Radiact. Isotopes.

208.- BAILLIE, L.A. Int. J. Appl. Radiact. Isotopes 8,1-6 (1960).

209.- SAFFRAM, M. y SHALLY, V. Endocrinology. 56,523-528 (1958).

210.- KREBS, H.A. y HENSELEIT, K. Hoppe-Seyleylers. Z. Physiolog. Chem. 33, 210-214 (1932).

211.- STRAND, L.J.; SWANSON, A.L., MANNING, J.; BRANCH, S. y MARVER, H.S. Analytical Biochem. 47, 457-470(1972).

212.- KAUFMAN, S. y ALIVISATOS, S.G.A. J. Biol. Chem. 216, 141-152 (1955).

213.- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; KARR, A.L. y RANDALL, R.J. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1953).

214.- VAN LIMBORGH, J. Arch. Anat. Microsc. Morph. Exp. 57, 79-90 (1968).

215.- BEGUE, R.J.; GUSTAFSSON, J.A. y GOLDMAN, A.S. Endocrinology 5(1), 238-246 (1971).

216.- GOLDMAN, A.S.; GUSTAFSSON, J.A. y GUSTAFSSON, S.A. Acta Endocrinol. 73, 146-170 (1973).

217.- CIGORRAGA, S.B.; DUFAU, M.L. y CATT, K.J. J. Biol. Chem. 253(12), 4237-4304 (1978).

218.- MENARD, R.H.; STRIPP, B. y GILLETTE, J.R. Endocrinology 94(6), 1628-1636 (1974).

219.- MENARD, R.H.; BARTTER, F.C. y GILLETTE, J.R. Arch. Biochem. Bioph. 173, 395-402 (1976).

220.- GOLDMAN, A.S. J. Clin. Endocrinol. Metab. 27, 320-324 (1967).

221.- GOLDMAN, A.S. J. Clin. Endocrinol. Metab. 27, 326-332 (1967).

222.- GIAVARINI, Ida en "Tratado de Avicultura" pp. 187-198 Ediciones Omega S.A. Barcelona. España. 1971.

223.- TENG,C-S. y TENG,C.T. Biochen. J. 150,191-194(1975).

224.- TENG,C-S. y TENG,C.T. Biochen. J. 154,1-9 (1976).

225.- GROENENDIJK-HUIJBERS,M.M. Anat.Rec. 142,9-19 (1962).

226.- HERTZ,R; FRAPS,R.M. y SEBRELL,W.H. Proc.Soc.Exp. Biol.Med. 52, 142-144 (1943).

227.- O'MALLEY,B.W. Biochemistry 6, 2546-2551 (1967).

228.- PALMITER,R.D.; MOORE,P.B. y MULVIHILL,E.R. Cell 8, 557-572 (1976).

229.- SUTHERLAND,R.L; LEBEAM,M.C.; SCHMELCK,P.H. y BEAULIEU, E.E. Febs.Lett. 79, 253-257 (1977).

230.- LEVY, C.; MĚSTER,J. y BEAULIEU, E.E. J.Endrocrinol, 90,1-7 (1981).

231.- IDLER,D.R.; WALSH,J.M.; KALLIECHARAN,R. y HALL, B.K. Gen.Comp. Endrocrinol. 30,539-540 (1976).

232.- BOTTONI,L. y MASSA,R. Gen.Comp.Endrocrinol. 43,532-536 (1981).

233.- LANTOS,C.P. en "Hormones in Normal and Adnormal Human tissues". Vol.II. Ediciones Fotherby,K. y Pal,S.B. Walter de Gruyter,Berlín.

234.- DORFMAN,R.I. y UNGAR,F. en "Metabolism of steroid hormones" VII, pp 69-132.Ediciones Burgess Publishing Co., Minneapolis. Minn.