



"CULTIVO DE ORGANO DEL CUERPO LUTEO:
OBSERVACIONES MORFOLOGICAS Y FUNCIONALES"

T E S I S

QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA

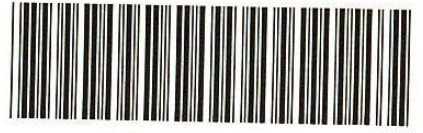
P R E S E N T A

M.C.P. ELVA LETICIA SAENZ BUSTAMANTE

MONTERREY, NUEVO LEON

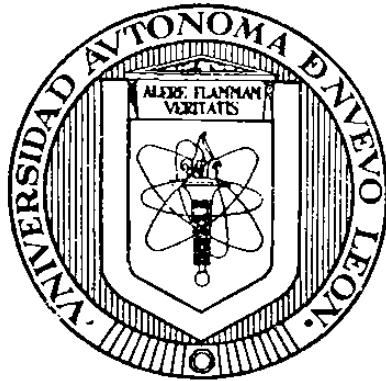
DICIEMBRE DE 1993.

TM
26658
PM
1993
824



1020091249

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



"CULTIVO DE ORGANO DEL CUERPO LUTEO:
OBSERVACIONES MORFOLOGICAS Y FUNCIONALES"

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON

ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA

PRESENTA

M.C.P. ELVA LETICIA SAENZ BUSTAMANTE



MONTERREY, NUEVO LEON

DICIEMBRE DE 1993

TM
26659
F. 11
1953
C:



FONDO TESIS

32085

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

"CULTIVO DE ORGANO DEL CUERPO LUTEO:
OBSERVACIONES MORFOLOGICAS Y FUNCIONALES"

TESIS

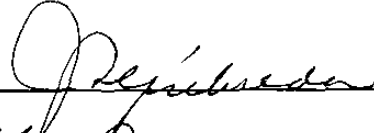
QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA

PRESENTA

M.C.P. ELVA LETICIA SAENZ BUSTAMANTE

COMISION DE TESIS INTEGRADA POR:

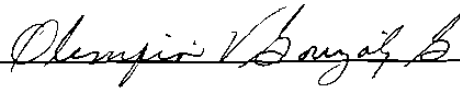
M.C.P. y Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra



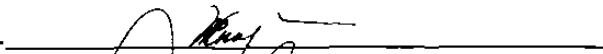
M.C.P. y M.C. Beatriz González C.



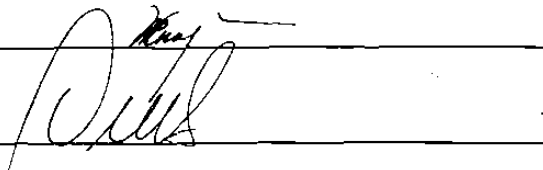
Biól. M.C. Olimpia V. González G.



M.C.P. y M.C. María Esthela Morales P.



M.C.P. y Dr. Med. Oscar de la Garza C.



MONTERREY, N.L.

DICIEMBRE DE 1993.

INDICE

I.- Introducción.....	1
II.- Material y Métodos.....	9
III.- Resultados.....	14
IV.- Discusión.....	28
V.- Resumen.....	31
VI.- Bibliografía.....	33
VII.- Apéndice.....	1

El trabajo de investigación se efectuó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

ASESOR: MCP y Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra.

AGRADECIMIENTOS

Al concluir el presente trabajo mi más sincera gratitud al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, Coordinador de la Maestría en Ciencias con especialidad en Morfología, por la asesoría y apoyo constante durante mi formación académica.

Al Q.B.P. Juana María Reyes por su valiosa colaboración durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Hugo Barrera S. y a la Dra. Diana Reséndez P., por la asesoría que me brindaron durante el aislamiento y cuantificación del D.N.A.

Al Dr. Argelio Santos Martínez, Director de la Clínica de Ginecobstetricia PROFEM, por el apoyo que recibí durante la inmunovaloración de los explantes.

Al Dr. Francisco Hernández Batres, así como al Dr. Juan Manuel Solís Soto, por su desinteresada colaboración en la obtención del material fotográfico.

A la Sra. María de la Luz Elizondo de Cepeda, por su amable participación en la parte técnica del trabajo.

Al Sr. Mario Alberto Valdez, Instructor del Departamento de Histología, por la asesoría brindada en la captura de Información del presente trabajo.

Y a la Srita. Alicia Aguilar, quien colaboró en la impresión del escrito.

Va mi agradecimiento a todas las personas que de alguna manera hicieron posible que este trabajo llegara a su término.

DEDICATORIA

Gracias a mi esposo Dr. Juan Enrique Leal, por su infinita paciencia y comprensión y a mis queridos hijos, Juan Enrique y Hugo Mauricio.

INTRODUCCION.

a) ANTECEDENTES:

El cuerpo lúteo, es una estructura cíclica post-ovulatoria con funciones esteroideogénicas de gran importancia durante la época reproductiva en las diversas especies de mamíferos, incluyendo al hombre. Se encuentra constituido por dos poblaciones celulares: las células teca luteínicas que proceden de la teca interna, y las células granulosa luteínicas que toman su origen en la capa granulosa del folículo roto. Las características de los dos tipos celulares son muy similares, sin embargo existen peculiaridades que las distinguen, ya que las células grandes o granulosa luteínicas contienen más organelas celulares y se ha demostrado (19, 58, 29) que poseen receptores a prolactina (53) y a ciertas prostaglandinas, (3, 42) , además el número de receptores a la hormona folículo estimulante (FSH) es más abundante que en las células teca luteínicas, en cambio, en las últimas predominan los receptores a la hormona luteinizante (LH), (34, 19, 35). El funcionamiento de ambas, es regulado por el eje hipotálamo-hipofisario, a través de las hormonas (FSH) y (LH) secretadas por la adenohipófisis de tal manera que las dos poblaciones celulares poseen receptores hormonales a las gonadotropinas hipofisarias, (34, 19, 29). Estos receptores se encuentran en la superficie de la membrana celular (34) y ejercen su actividad a través de la adenilciclase, enzima de naturaleza lipoproteica que se localiza por dentro de la membrana celular (54, 26), y la cual cataliza la formación de AMP cíclico a partir de ATP (trifosfato de adenosina) con liberación de iones calcio (37); en consecuencia ésta desencadena el mecanismo celular de la síntesis esteroidea. El cuerpo lúteo sintetiza andrógenos, estrógenos y progesterona, como sucede en el folículo pre-ovulatorio (45, 50, 67) sin embargo la progesterona es el principal esteroide que se origina en el cuerpo lúteo post-ovulatorio y pregestacional, además éste esteroide que es muy inestable, se torna estable en presencia del cuerpo lúteo (10). Existen evidencias histoquímicas y bioquímicas que confirman que el colesterol es el principal sustrato utilizado en la producción de progesterona en las células granulosa luteínicas (34, 39, 57, 56).

El colesterol se encuentra en abundancia en el citoplasma de las células granulosa luteínicas en forma de gránulos, constituidos por ésteres de colesterol, sin embargo a partir de acetato activo se pueden sintetizar pequeñas cantidades de progesterona (4, 34). El estudio "in vitro", y la incubación han permitido conocer muchos aspectos del cuerpo lúteo en cuanto a función y comportamiento, aprovechando que ésta estructura "in vitro" conserva su autonomía semejando al cuerpo lúteo "in vivo", ya que por un corto período de tiempo después de la ovulación, puede proseguir la esteroideogénesis sin estímulo endócrino (70).

Las poblaciones celulares del cuerpo lúteo pueden ser cultivadas "in vitro" en forma aislada o en combinación, ya que los avances metodológicos recientes han hecho posible la obtención de células aisladas procedentes del compartimiento teca luteínico y granuloso luteínico del cuerpo lúteo (9, 62, 29, 35).

Este procedimiento ha permitido caracterizar desde el punto de vista morfológico, como bioquímico dos poblaciones celulares ya mencionadas: las células pequeñas y las células grandes; (9, 62, 29, 65, 52). Los estudios se han realizado tanto en humanos como en otros mamíferos. Las células pequeñas como ya se indicó, se originan de células de la teca interna (62), con un diámetro aproximado de 18 micras y las células grandes, que proceden de las células granulosas del folículo post-ovulatorio y presentan un diámetro de 30 micras por término medio (9, 62). A la observación a través de microscopía de barrido, la mayoría de ambas poblaciones celulares presentan forma esférica o ligeramente elongada y muestran en su superficie protrusiones digitiformes de tamaño variable, con apariencia lisa, que se disponen en cúmulos (9). Otros investigadores (20, 51) han demostrado la existencia de un tercer tipo celular conocido como células K, las cuales se han caracterizado a nivel de microscopía óptica como células pequeñas de citoplasma eosinófilo, núcleo hipercromático dispuestas en cúmulos que presentan características esteroideogénicas. Fujita en 1981 y Takahedi Mori en 1983 (20, 51), sugieren que su producción sea androgénica, ya que solo se han detectado en cuerpos lúteos muy jóvenes, y de acuerdo con otros autores (44) la concentración de testosterona y androstendiona es muy elevada en las etapas iniciales de desarrollo del cuerpo lúteo.

Existen reportes (1, 62, 65, 52) en los cuales se han puesto en duda el origen de las poblaciones que constituyen el cuerpo lúteo. Esta propuesta la apoyan en estudios previos en los cuales aplicaron anticuerpos monoclonales de reconocimiento, como marcadores de la superficie para las células de la teca y de granulosa respectivamente, éstos fueron aplicados en distintas fases del desarrollo, detectando una población no marcada por ninguno de los dos anticuerpos a partir del doceavo día post-ovulatorio, por lo que suponen que éstas poblaciones pudieran provenir de un sistema generador celular, el cual pudiera encontrarse dentro del cuerpo lúteo o emigrar a él después de la ovulación, y contribuir a su desarrollo, como en el caso de las células sanguíneas.

La progesterona se sintetiza principalmente en las células granulosa luteínicas (51, 56), pero no es función exclusiva de éstas células, investigadores han demostrado que pequeñas cantidades de progesterona pueden ser sintetizadas en la teca interna (39, 57, 40, 43). Meredith Lemon y col. (39) realizaron investigaciones en el cuerpo lúteo de cerdo "In vitro", y encontraron que ambos tipos celulares poseen la enzima delta 5-3 B α l deshidrogenasa (3 BHSD), la cual se

encuentra involucrada en la transformación de pregnenolona a progesterona; esta función se puso en evidencia al agregar al cultivo trilostane (compuesto sintético análogo a la etinilttestosterona, el cual inhibe la actividad de la 3 BHSD) en consecuencia, la producción de progesterona fue anulada.

Las poblaciones celulares del cuerpo lúteo ejercen interrelación funcional muy estrecha (58), ésto ha quedado corroborado por numerosos estudios realizados por varios autores (40, 51, 39, 55, 42). Las células granulosas luteínicas aisladas, al ser incubadas aumentan considerablemente la producción de progesterona cuando son puestas en contacto con las células teca luteínicas (39). El factor estimulante pudiera ser la testosterona o dihidrotestosterona, esteroides que han demostrado aumentar la producción de progesterona cuando son agregadas al cultivo de células granulosas luteínicas aisladas (24, 58, 50). Gregoraszczyk en 1985 (24), reportó que el agregar estradiol al cultivo de cuerpo lúteo de bovino, favoreció la producción de cantidades considerables de testosterona en el medio. Trabajos previos realizados por algunos autores (11, 68) demostraron que el 17 B. estradiol estimula la actividad de la 17 - 20 liasa vía delta 4 progesterona, la cual propició la conversión de progesterona a testosterona.

Se ha establecido que el principal origen de la progesterona son las células luteínicas del folículo post-ovulatorio. (58, 48), y que es posible que la progesterona producida por ellas puedan difundir hacia las células teca luteínicas y de esta manera servir de substrato en la síntesis de andrógenos (30) y estos a su vez son convertidos a estrógenos por las células granulosas luteínicas (40, 22). Los resultados de estas investigaciones confirman la hipótesis propuesta por Dorrington en 1975 (12), la cual sugiere "que son necesarias dos células y dos gonadotropinas en la biosíntesis de estrógenos". Esta hipótesis ha sido corroborada a través de los trabajos efectuados por numerosos investigadores (17, 29, 55).

b) JUSTIFICACION DEL TRABAJO:

En los antecedentes se describió una panorámica del perfil morfológico y funcional del cuerpo lúteo, en el que se pusieron de manifiesto las peculiaridades de sus aspectos funcionales, como la necesaria interrelación de sus poblaciones celulares (42, 65), su autonomía (70) y los cambios que presenta en la esteroidogénesis a través de su maduración (45, 59). Por éstas razones se seleccionó el cultivo de órgano como método de estudio, ya que éste sistema ofrece las siguientes ventajas: 1) Conserva la arquitectura estereoespacial del tejido, semejante a las condiciones "in vivo", 2) Mantiene la estructura histológica normal del órgano, 3) Las células que lo forman pueden seguir realizando sus funciones específicas (61, 18, 2); por lo que se considera un

método de investigación adecuado para una estructura tan dinámica como el cuerpo lúteo. Al efectuar una revisión bibliográfica de los autores que han utilizado el cultivo de órgano en el estudio del cuerpo lúteo, se encontraron solo 12 trabajos reportados entre enero 1980 a mayo de 1993 (46, 63, 7, 32, 36, 70, 28, 31, 14, 47, 23, 42). En la metodología utilizada por estos autores pudimos observar que la siembra de los explantes la realizaron depositándolos directamente en las placas de cultivo (31) en rejillas de acero (70) o bien fijándolos con histoacríl (goma especial para tejidos) como en el caso de efectuar microdiálisis al explante (42, 47). Por otro lado, algunos autores han confirmado las ventajas de utilizar substratos orgánicos en el cultivo de órganos, de tejidos altamente especializados como pulmón, hígado, sistema nervioso, músculo (60, 41, 27). Estos diferentes criterios en la metodología nos motivaron una interrogante, ¿Podría haber diferencia entre un explante cultivado con substrato orgánico y otro sin él, bajo las mismas condiciones de cultivo?. El substrato aplicado a los explantes fue utilizado desde los inicios del cultivo de tejidos a principios del siglo por Carrell 1912 (8), Fell 1922 (16), Wolff 1952 (69), quienes colocaron los explantes sobre medios naturales como plasma, suero y extractos embrionarios en estado de coagulación, procedentes de pollo, cobayo, feto de ternera y humano. Con el tiempo llegaron a concluir que no eran los soportes ideales, ya que presentaban algunas desventajas entre ellas el ser fagocitados por las células del explante; por lo que se buscó experimentar con otro tipo de materiales más adecuados para el propósito, como las rejillas de acero inoxidable, el filtro de milliporo, trozos de papel, del que se utiliza para limpiar cristales de los lentes, o bien sobre una fina capa de gel agar: posteriormente como una alternativa a los medios naturales surgió el colágeno (38, 64), gracias a sus características tridimensionales ha resultado de gran utilidad en el cultivo de órgano (38), inicialmente se obtuvo como extracto de cola de rata (5) y en fecha reciente se ha elaborado en forma de gel de colágeno como el Gelfoam (13). Esta matriz tridimensional presenta la ventaja 1) De no ser fagocitada por las células del explante, 2) Su uso simplifica el mantenimiento del cultivo a largo plazo, 3) Ofrece una superficie sobre la que las células pueden adherirse rápidamente; 4) Su propiedad más relevante es su capacidad de promover y mantener la diferenciación celular en las células altamente especializadas como las pertenecientes al sistema nervioso, muscular e hígado mucho mejor que otros materiales (41). Tomando en cuenta las ventajas del substrato orgánico surgió la hipótesis de trabajo que a continuación enunciamos.

c) HIPOTESIS DE TRABAJO

Los explantes del cuerpo lúteo en cultivo de órgano, colocados sobre una matriz orgánica presentan una mejor preservación en cuanto a estructura y función así como un buen

mantenimiento de la diferenciación, que aquellos explantes colocados directamente sobre una superficie inerte.

d) OBJETIVOS

1.- Implementar un sistema de cultivo de órgano para el tejido luteínico que permita su mantenimiento viable y funcional óptimo.

2.- Cultivar explantes de cuerpo lúteo en dos modalidades, con y sin sustrato orgánico hasta por tres días, y comparar la evolución de ambos a las 24, 48 y 72 horas.

3.- Analizar, el mantenimiento de la estructura a nivel de microscopía de luz y su funcionalidad, por medio del Radioinmunoanálisis (R.I.A.) para detectar producción de progesterona y estrógenos.

4.- Comparar los datos obtenidos con un análisis estadístico.

MATERIAL Y METODOS.

Se utilizaron cuerpos lúteos de ratones albinos *mus musculus* Cepa CD-1 en el día 17 de gestación. El procedimiento se inició con el sacrificio del animal por dislocación cervical, de inmediato se efectuó una laparatomía y se extrajeron ambos ovarios, en éste último paso se utilizó material quirúrgico fino previamente esterilizado (pinza de Adson, bisturí # 11). Los ovarios se depositaron en una caja de Petri con 2 ml. de sol. de Hanks, se llevó a la campana de flujo laminar, ubicada en un cuarto estéril colocándose bajo el estéreomicroscopio donde se efectuó la disección del cuerpo lúteo, una vez disecado se colocó en una segunda caja de Petri a la que se le agregaron 2 ml. de medio de cultivo (para evitar desecación), se procedió a fraccionar el mismo en pequeños fragmentos de un milímetro de espesor por lado, para lograr esto último se colocó una regla milimétrica bajo la caja de Petri.

Una vez obtenido el total de fragmentos se procedió a tomarlos con una pipeta Pasteur y a depositar 3 fragmentos en cada fosesta de la cámara de cultivo, la cual se preparó previamente dentro de la campana de flujo laminar de la siguiente manera: las cámaras constan de ocho fosestas de una capacidad de 0.7 ml, a cuatro de ellas se les colocó un cojincillo de Gelfoam, que en el resto fue omitido. A continuación se les agregó 0.4 ml de medio esencial mínimo modificado

por Dulbecco (MEM) y medio F12 de Ham en proporción de 1:1 + 100 microgramos de estreptomycin por ml. Finalmente la cámara se colocó en la incubadora a 37°C, en un ambiente de 95% de aire y 5 % de CO₂ y con alto grado de humedad. El medio se renovó cada 24 hrs. Paralelamente al procedimiento metodológico que ya se expuso, se tomaron 2 cuerpos lúteos completos, uno de ellos fue homogenizado en 2 ml de medio de cultivo (ya descrito) depositado en un vial y enviado para su inmuovaloración por el método de Radioinmunoanálisis para obtener las concentraciones hormonales del tejido luteínico en fresco. El segundo cuerpo lúteo fue fragmentado (como ya se describió) y procesado por métodos convencionales de microscopía electrónica (de igual forma que a los explantes cultivados, como se detalla más adelante). La preparación obtenida se conoce como tiempo cero y nos sirvió como modelo de comparación durante la evaluación morfológica de los cultivos.

Los explantes en cultivo se detuvieron a las 24, 48 y 72 hrs. Pasadas las primeras 24 hrs. se detuvieron las dos primeras foseetas, una con Gelfoam y otra sin Gelfoam como a continuación se detalla: Para llevar a cabo la detención de los cultivos, la cámara se retiró de la incubadora y se colocó en la campana de flujo laminar, una vez ahí se extrajo el medio utilizando una pipeta Pasteur, y se colocó en un vial de cristal el cual se tapó herméticamente y se llevó a congelación a -20°C, para posteriormente detectar la presencia de Progesterona (P) y Estradiol (E2) por medio del método de RIA. Los explantes se colocaron en viales los cuales se habían provisto con sol. fijadora de Ito y Karnovsky (33) y se colocaron en refrigeración a 4°C para posteriormente procesarse por métodos convencionales de microscopía electrónica. En los cultivos de las foseetas correspondientes a las 48 y 72 hrs. el medio fue renovado y se detuvieron como ya se describió.

Una vez reunidos los explantes de todos los tiempos de cultivo, bajo las dos condiciones establecidas, se procedió a retirar de refrigeración los mismos, para procesarlos por el método convencional de microscopía electrónica como se describe a continuación:

- 1.- Fijar en solución de Ito y Karnovsky, de 12 horas como tiempo mínimo a 72 horas como tiempo máximo.
- 2.- Enjuagar en buffer de cacodilatos pH 7.4 tres cambios de 5 minutos cada uno.
- 3.- Post-fijar en tetróxido de osmio al 2% en buffer de cacodilatos pH 7.4 a 4°C por 40 minutos.
- 4.- Lavar en buffer de cacodilato, tres cambios de 5 minutos cada uno.
- 5.- Teñir en bloque con nitrato de uranilo al 1% 30 minutos.
- 6.- Deshidratar en acetona de 30%, 50%, 70% y 95%, cinco minutos cada uno, acetona 100% tres cambios de 5 minutos cada uno.
- 7.- Preincluir en acetona y epon puro en una porción de 50% cada uno por 60 minutos.

8.- Incluir en epon y polimerización de 12 a 72 hrs. a 65°C

Transcurrido el tiempo requerido para la polimerización, el explante queda incluido en un molde de resina de forma rectangular, y al extremo más próximo al explante se le dio forma de pirámide rebajándolo con una navaja tal como se hace, al sacar punta a un lápiz. A continuación el molde quedó listo para ser cortado en el ultramicrotomo L.K.B. Ultratome V a un grosor de una micra. Como siguiente paso se montaron en portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina (sol. acuosa al 5%), se llevaron al fotomicroscopio de luz Karl Zeiss donde se evaluaron las condiciones morfológicas de los explantes.

DETERMINACION DEL D.N.A.

Para establecer una relación cuantitativa entre la esteroidogénesis de las células del explante en cultivo, y las concentraciones hormonales en el medio, reportadas por el R.I.A., se efectuó una determinación del D.N.A.; ya que ésta última permitió corregir las diferencias atribuibles a las distintas dimensiones del explante, y así obtener resultados más precisos. Para llevar a cabo la determinación del D.N.A., se seleccionó el método combinado de Burton (6) y Tsai (66) en el cual se utiliza como testigo D.N.A. de timo de ternera tipo I; la técnica se aplicó primero para la estandarización de la curva de calibración, la que tiene por objeto establecer las concentraciones adecuadas de D.N.A. tipo I en el rango ideal de trabajo, las que deben ser similares a las del D.N.A. del explante luteínico en estudio. Las concentraciones de D.N.A. tipo I que resultaron adecuadas al estudio, quedaron en el rango de $5\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$, $15\mu\text{g}$, $20\mu\text{g}$, y $25\mu\text{g}$, cada determinación se realizó por triplicado, además de los cuatro explantes de la muestra problema y de una muestra control, en la que se omitió el D.N.A., recibiendo el resto de los reactivos como se indica en la técnica. Con el valor promedio de la absorbancia que se obtuvo de la lectura de las concentraciones del D.N.A. tipo I, se elaboró la curva de calibración que se muestra en el apéndice Tabla I, Fig. I.

Una vez obtenido el rango ideal de trabajo se procedió a correr el total de las muestras problema. La técnica se describe a continuación:

- 1.- Colocar 3 fragmentos del tejido en tubos de Ependorff en hidrólisis alcalina por medio de NaOH, 0.5 M a 37°C por 18 horas.
- 2.- Agregar 0.2 ml. de albúmina de una concentración de .1 mg/l.
- 3.- Neutralizar añadiendo 0.4 ml. de ácido tricloroacético (TCA) al 50% y refrigerar 4°C por 10 minutos.

- 4.- Centrifugar a 2000 r.p.m./10' descartar sobrenadante, el botón resultante se conservará.
- 5.- Lavar el botón con 0.5 ml. de TCA al 15%.
- 6.- Centrifugar 2000 r.p.m./10' descartar sobrenadante.
- 7.- Lavar el botón en 0.2 ml. de NaOH 0.1 M.
- 8.- Centrifugar a 2000 r.p.m./10' descartar sobrenadante.
- 9.- Resuspender el botón en 1 ml. de etanol al 100% e incubar a 60°C durante 15 minutos.
- 10.- Centrifugar a 2000 r.p.m./10', dejar secar toda la noche (por 10 a 14 horas).
- 11.- Resuspender el botón seco en ácido perclórico (P.C.A.) .4 N 1 ml
- 12.- Colocar D.N.A. standard de timo temera 1 mg./l. Std. 5 μg , 10 μg , 15 μg y 20 μg :
Por triplicado cada concentración en tubos de Ependorff de 1.5 ml.
Aforar con P.C.A. .4 N 1 ml.
- 13.- Sumergir ambos grupos de tubos en H₂O a 90°C durante 15 minutos.
- 14.- Centrifugar a 4000 r.p.m./15 minutos.
- 15.- Eliminar precipitado y tomar sobrenadante.
- 16.- Pasar el sobrenadante a tubos de borosilicato y agregar reactivo de difenilamina 2 ml., dejar en la obscuridad toda la noche (14 a 16 horas como tiempo máximo).
- 17.- Leer en el espectrofotómetro y examinar a una longitud de onda de 600 nm.

RESULTADOS

a) MORFOLOGIA:

La evaluación morfológica del tejido luteínico se inicia con la descripción del cuerpo lúteo tiempo cero, (fig. 1) donde se puede observar tejido luteínico constituido por dos poblaciones celulares, las células granulosas luteínicas y las células teca luteínicas, ambas muestran formas poliédricas: (las últimas de menor tamaño y con basofilia acentuada), núcleo grande excéntrico con prominente nucleolo y cromatina dispuesta en la periferia, la envoltura nuclear bien delimitada, el citoplasma de aspecto vacuolado, los límites celulares aparecen bien definidos, escaso tejido conectivo laxo, fibroblastos y vasos sanguíneos de pequeño calibre en cuya luz se observan eritrocitos.

En el estudio morfológico de las primeras 24 horas de cultivo bajo las dos modalidades en estudio se observó que los explantes en general conservaron aspecto estructural muy semejante al tiempo cero, sin embargo en los explantes en que fue omitida la matriz orgánica algunas de las células no muestran límites celulares definidos, en cambio en los citoplasmas de ambos tipos de cultivo, se observó una vacuolización bien conservada, núcleos con envoltura nuclear bien delimitada, cromatina dispuesta en la periferia y algunos de ellos se muestran heterocromáticos y de menor volumen, nucleolos prominentes, abundantes vasos sanguíneos, con eritrocitos y algunas células de la fórmula blanca dentro de su luz.

Las condiciones morfológicas de los explantes de tejido luteínico de 48 horas de cultivo bajo las dos modalidades en estudio, al compararse con el tiempo cero, mostraron una disminución de volumen y de vacuolización, algunas células de los explantes colocados sobre matriz orgánica mostraron extracción citoplasmática (fig. 3a, flechas), pero la diferencia más notable entre los dos sistemas propuestos, lo constituyó una mejor preservación de las células provenientes de cultivos colocados sobre substrato orgánico en comparación con aquellas en que éste fue omitido, en donde los núcleos se observaron hipercromáticos y retraídos (fig. 3b, flecha), los límites celulares no se mostraron definidos en ambos sistemas de cultivo.

El aspecto morfológico de los explantes correspondientes a las 72 horas, colocados sobre matriz orgánica, las células mostraron gran disminución de volumen, escasa vacuolización, núcleos y citoplasmas claros con límites celulares no definidos. En los cultivos donde el substrato

orgánico fue omitido, se observaron células disminuidas de volumen y pérdida de la vacuolización celular. En el margen inferior izquierdo de la figura 4b, se aprecia núcleo con dos nucleolos, los límites celulares son imprecisos.

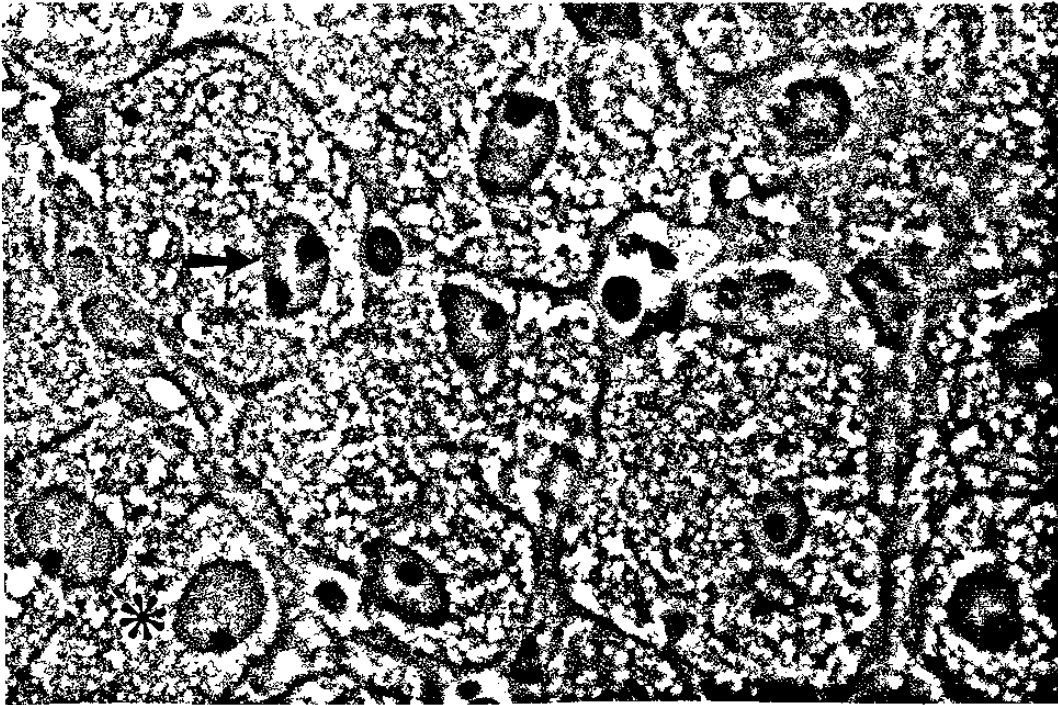


Fig. 1. Corte semifino de tejido luteínico sin cultivar (Tiempo cero) teñido con azul de toluidina. Muestra células granulosoluteínicas de forma poliédrica de gran volumen, límites celulares bien delimitados, citoplasma vacuolar, núcleo excéntrico con prominente nucleolo, algunas con dos. (⇔). Se observan además, células más pequeñas de las mismas características que corresponden a las células tecaluteínicas (*). al centro capilar sanguíneo con eritrocito en su luz (▀). 100.8x.

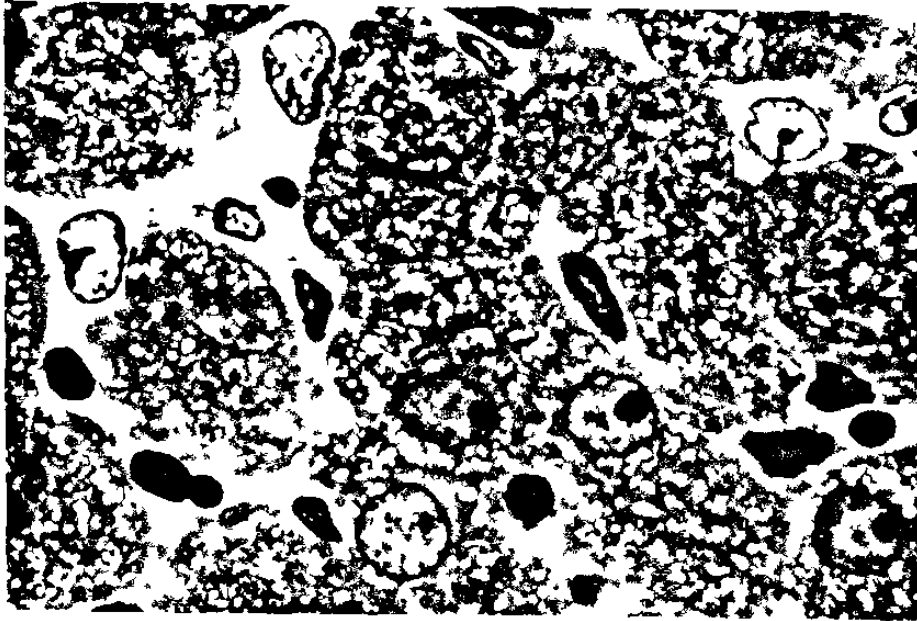


Fig. 2a. Corte de cuerpo lúteo 24 hrs de cultivo, con Gelfoam teñido con azul de toluidina que muestra células luteínicas que conservan vacuolización. 100.8x.

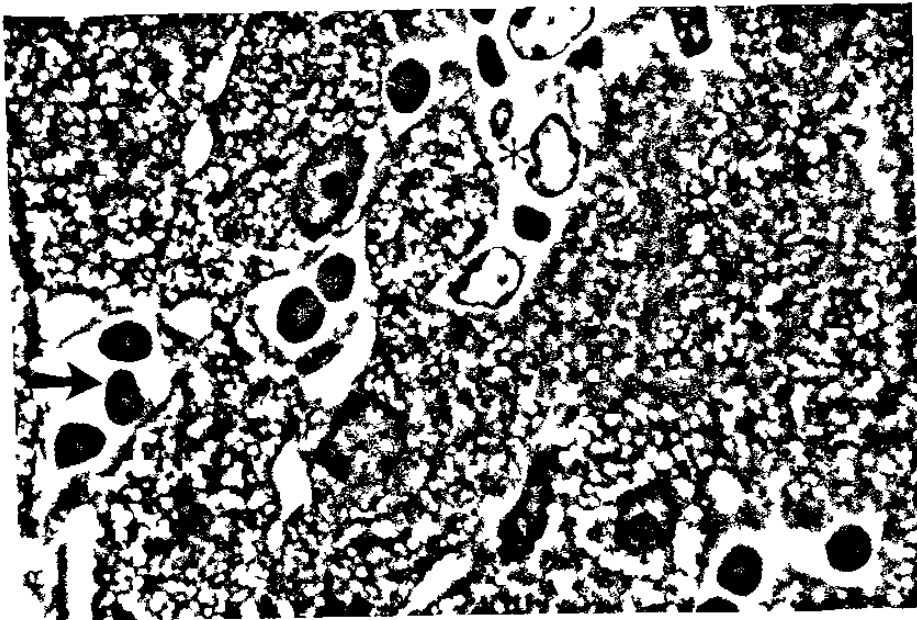


Fig. 2b. Corte de cuerpo lúteo 24 hrs de cultivo sin Gelfoam teñido con azul de toluidina donde se aprecian células luteínicas que han perdido vacuolización y límites celulares vasos sanguíneos con eritrocitos (→) y células de la fórmula blanca (*). 100.8x.

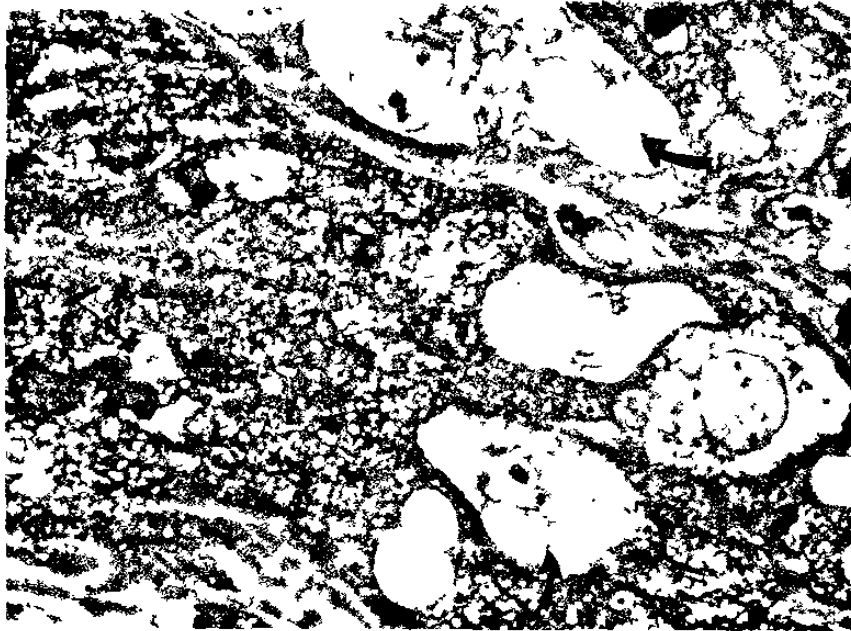


Fig. 3a. Corte de tejido luteínico 48 hrs. de cultivo con Gelfoam teñido con azul de toluidina, con células luteínicas disminuídas de volúmen con extracción citoplasmática. (→). 100. 8x.

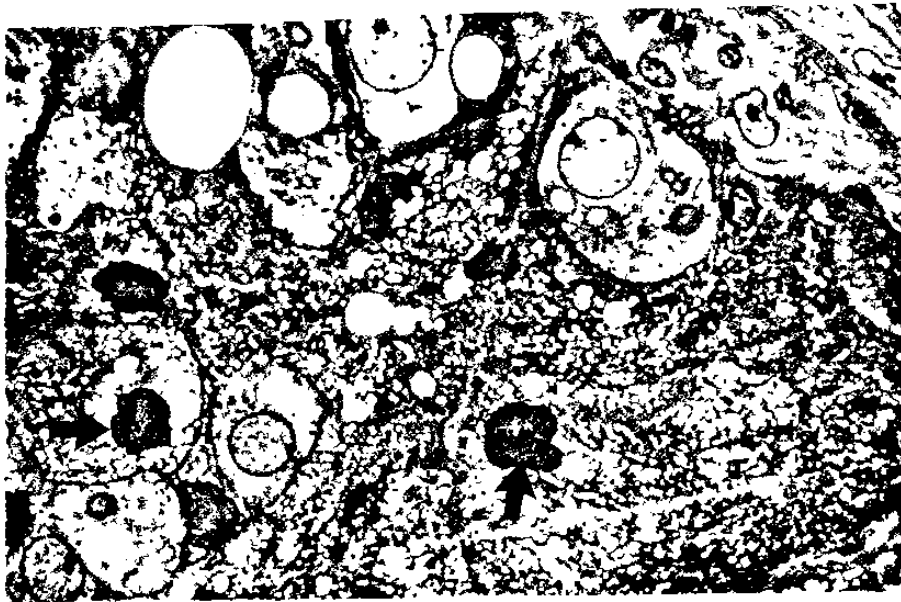


Fig. 3b. Corte de tejido luteínico de 48 hrs cultivado sin Gelfoam teñido con azul de toluidina muy parecido al anterior no hay limites celulares precisos, algunas células muestran núcleo heterocromático (→). 100. 8x.

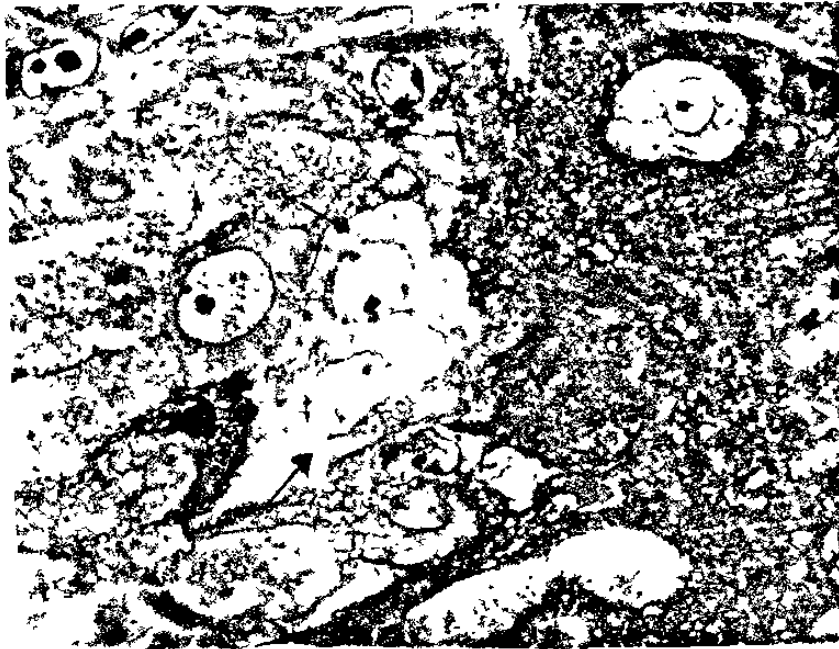


Fig. 4a. Corte de cuerpo lúteo 72 hrs de cultivo con Gelfoam que muestra células luteínicas en franca disminución de la vacuolización con núcleos y citoplasmas claros (→) y límites celulares indefinidos. 100.8x.

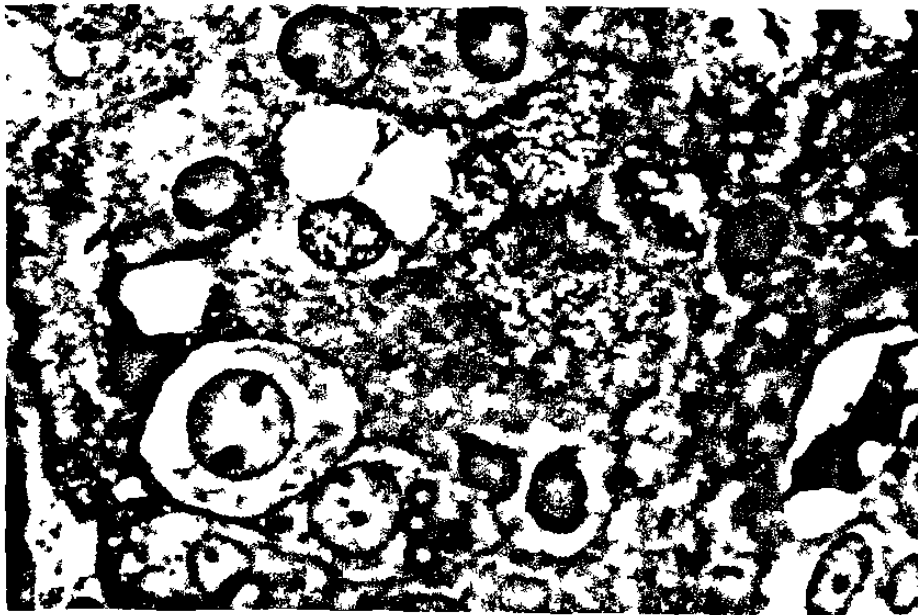


Fig. 4b. Corte de cuerpo lúteo 72 hrs. de cultivo sin Gelfoam donde se aprecia disminución del volumen celular, se ha perdido la vacuolización. 100.8x.

b) CUANTIFICACION DEL D.N.A.

En el resultado obtenido de la cuantificación del D.N.A. por las técnicas de Burton (6) y Tsai (66) se estableció un rango entre el 17.9 y 18.6 μg de D.N.A. por explante, la tabla con los resultados en detalle se muestra en el anexo, Tabla II.

c) PRODUCCION DE HORMONAS.

Los estudios de radioinmunoanálisis se efectuaron por triplicado en cada tiempo y tipo de cultivo, y además al medio nutriente aislado utilizado en el cultivo, se le efectuó el mismo estudio (RIA), Tabla I.

Tabla I

Estradiol	No detectable
Progesterona	No detectable

Resultados del R.I.A. en el medio de cultivo.

Los resultados obtenidos por medio del R.I.A. en el cuerpo lúteo "in situ" se muestran en las tablas II y III.

Tabla II

E. $\mu\text{g}/\text{ml}$	E. $\mu\text{g}/.4\text{ml}$
7.69	3.07

Concentración de estrógenos en el cuerpo lúteo "in situ".

Tabla III

P. ng/ml	P. $\text{ng}/.4\text{ml}$
0.280	0.112

Niveles de progesterona en el cuerpo lúteo "in situ"

A continuación se incluye tabla IV con los resultados definitivos expresados en picogramos de hormonas (E2 P) por microgramos de D.N.A. elaborada con la media \bar{X} de los mismos.

Tabla IV

TIEMPO	CONDICIONES DE CULTIVO	ESTROGENOS (E ₂) pg/ μ g D.N.A.	PROGESTERONA pg/ μ g D.N.A.
24 hrs	con Gelfoam	\bar{X} 20.8270	\bar{X} 1.0745
	sin Gelfoam	\bar{X} 17.27	\bar{X} 1.752
48 hrs	con Gelfoam	\bar{X} 1.596	\bar{X} 0.895
	sin Gelfoam	\bar{X} 1.3995	\bar{X} 0.865
72 hrs	con Gelfoam	\bar{X} 6.65	\bar{X} 17.29
	sin Gelfoam	\bar{X} 3.0	\bar{X} 14.77

Los resultados de la tabla IV se utilizaron en diseño de diagrama en barras figs. 5a y 5b donde se puede observar la producción hormonal de los explantes bajo las dos modalidades de cultivo durante las 72 hrs. que duró el estudio.

ESTROGENOS

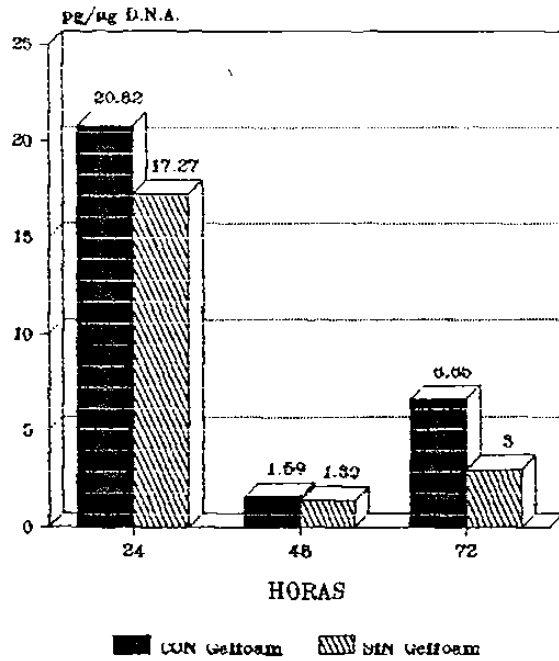


Fig. 5a.

Figs. 5a y 5b.

Gráficas que muestran la producción de estrógenos y progesterona por el explante bajo las dos modalidades de cultivo durante las 72 hrs. de estudio.

PROGESTERONA

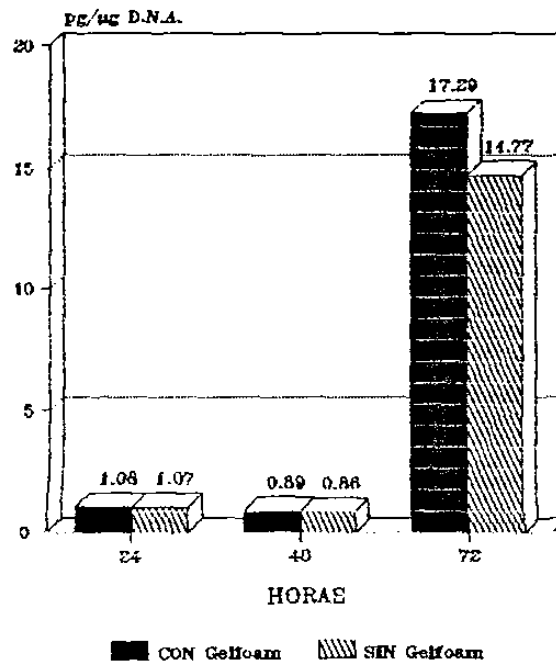


Fig.5b

Los resultados estadísticos se realizaron con la aplicación de un diseño de submuestreo en bloque completo azarizado, en donde se calculó: desviación standard y varianza en los diferentes tipos y tiempos de cultivo, prueba de hipótesis para diferencia de media con el enfoque de prueba T de Student; con valores para aceptar o rechazar la hipótesis de $T = - 2.77$ y 4 grados de libertad. Con la aplicación de éste método resultó que el valor de la T calculada fue mayor que la T de tablas; por lo que se concluye que si hay diferencia entre los dos sistemas de cultivo.

DISCUSION.

La hipótesis propuesta en el presente trabajo puede considerarse comprobada, ya que el método estadístico aplicado en los resultados funcionales apoya la misma al demostrar diferencias significativas entre los dos sistemas de cultivo, al comprobar una mayor producción hormonal en explantes colocados sobre substrato orgánico, con excepción de los explantes de 24 horas de cultivo donde la producción de progesterona fue igual en ambos sistemas en estudio, y de los explantes correspondientes a las 48 horas donde la producción de estrógenos y progesterona fue similar en las dos modalidades de cultivo. También en el estudio morfológico se observó mejor preservación de los explantes colocados sobre matriz orgánica. Por otra parte, si se toma en cuenta la actividad esteroideogénica de las células luteínicas de ambos sistemas de cultivo, durante las 72 horas que duró el experimento, lleva a considerar que al tejido luteínico en cultivo de órgano no le es indispensable el uso de matriz orgánica tal como sucede en otros tejidos, como pulmón, hígado, sistema nervioso practicado por algunos autores (41, 60, 27), quienes han confirmado la ventaja de su utilización; una explicación posible a nuestros resultados podríamos encontrarla en la misma naturaleza del cuerpo lúteo, el cual como sabemos es una estructura cíclica con un inicio de desarrollo e involución bien determinados (59), características que posiblemente tomen origen en la autonomía que posee (21), la que ha sido demostrada tanto in "vivo" al hipofisectomizar ratas al inicio de su gestación y observar que esta llegaba a su término (44). Como "in vitro", por Yuh 1986, al cultivar tejido luteínico sin estímulo endócrino, ni de alguna otra naturaleza conservando su capacidad esteroideogénica (70). La aportación de estos autores está de acuerdo con los planteamientos de Jones Seggar 1976 (34), el cual confiere que todos estos acontecimientos tienen origen a nivel molecular, ya que el cuerpo lúteo posee R.N.A. mensajero de larga duración.

Por otra parte, al obtener los resultados funcionales se observaron ciertos patrones en la producción hormonal, los cuales pudieran estar relacionados con lo anteriormente expuesto, como es el caso de la diferencia tan significativa en el valor medio de la P y E2, en cuanto a tiempos de cultivo. La elevada concentración de E2 durante las primeras 24 hrs. y la caída tan brusca a las 48 hrs., pudieran deberse al agotamiento de los precursores naturales existentes dentro de la célula, o bien pudieran obedecer a una programación genética de las células ya que se trabajó con cuerpo lúteo del día 17 de gestación y en esta especie el parto ocurre el día 19.

La elevada concentración de E2 se puede explicar tomando en cuenta que en los roedores tiene función luteotrófica, (25). Respecto a la producción de P sus variaciones pudieran igualmente obedecer a la programación celular ya establecida y al agotamiento de sus precursores (colesterol y pregnanolona). Además, otros investigadores han demostrado que en los roedores el día 15 de gestación la progesterona baja dramáticamente, y el estradiol aumenta o permanece igual (15). En este experimento se debe tener en cuenta que se trabajó con cuerpo lúteo muy próximo a la fecha del parto y que durante éste período ocurren ajustes hormonales importantes, se proponen más estudios a diferentes etapas de desarrollo del cuerpo lúteo (tanto del gestante como el del ciclo), de ser posible hasta su regresión.

CONCLUSIONES.

1.- Se cumplió con los objetivos propuestos al inicio del trabajo al implementar un sistema de cultivo de órgano para el tejido luteínico, el cual se mantuvo viable y funcional dentro de las 72 horas establecidas.

2.- Se probaron las dos modalidades de cultivo con y sin substrato orgánico y el resultado mostró que si existen diferencias en el mantenimiento de la estructura, bajo las dos modalidades propuestas.

3.- El análisis del mantenimiento de la estructura y su actividad esteroidogénica fueron positivos, ya que se detectó producción de estrógenos y progesterona, sin agregar estímulo de ninguna naturaleza, durante las 72 horas que duró el experimento.

4.- Enumerados nuestros objetivos, otra de las características del cuerpo lúteo que quedó corroborada fue la de su autonomía, propuesta por Yuh y col. en 1986.

RESUMEN

En el presente trabajo se cultivaron explantes de cuerpo lúteo procedentes de ratones albinos *mus musculus* Cepa CD-1 en el día 17 de gestación, y se compararon dos modalidades de cultivo, explantes depositados directamente en la fosa de cultivo y explantes colocados sobre soporte orgánico (cojincillo de Gelfoam) independientemente de las condiciones de cultivo a las fosetas se les agregó medio nutriente, que consistió en una mezcla de F12 de Ham y medio esencial mínimo (MEM) en proporción de 1:1 sin suero fetal y con antibióticos. Se incubaron a 37°C en 5% de CO₂ en aire y humedad. Los cultivos se detuvieron cada 24 horas hasta por 72 horas y se destinaron los explantes para estudio morfológico, procesándose por la técnica para microscopía electrónica hasta su inclusión en epoxyresina. Otros fragmentos se utilizaron para la extracción y cuantificación del D.N.A. por medio de la técnica combinada de Burton (6) y Tsai (66). El medio se utilizó para detectar la presencia de estrógenos y progesterona y la cuantificación de las mismas por medio de Radioinmunoanálisis y demostrar funcionalidad de los explantes. Las concentraciones de hormonas se expresan por unidades de D.N.A. Los resultados muestran que los explantes se mantienen viables por 72 horas con buena preservación de la histología, pudiéndose detectar secreción de estrógenos y progesterona en todas las muestras colectadas durante el tiempo que duró el cultivo. La comparación estadística de la concentración de hormonas mostró diferencias significativas en los dos sistemas comparados.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Alila H.W., Hansel W. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.* 31: 1015, 1984.
- 2.- Bacharach E., Itin A., Keshet E. "In vivo" patterns of expression of urokinase and its inhibitor PA1-1 suggest a concerted role in regulating physiological angiogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 89: 1068, 1992.
- 3.- Balmaceda R. Prostaglandin Production by Rhesus monkey corpora lutea in vitro: effects of estrogen administration. *Int. Gynecol. Obstet.* 18: 15, 1980.
- 4.- Behrman H.R. Prolactin induction of enzymes controlling luteal cholesterol ester turnover. *Endocrinol* 87: 1251, 1970.
- 5.- Bornstein M.B., Murray G. Serial observations on patterns of growth, myelin formation, maintenance and degeneration in culture of newborn rat and kitten cerebellum. *J. Biophys Biochem. Cytol.* 4: 449, 1958.
- 6.- Burton K. A study the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Medical research council, cell metabolism research unit, department of biochemistry. University of Oxford 1955.
- 7.- Carr B.R., Sadler R.K., Rochelle D.B., Stalmach M.A., Macdonald P.C., Simpson E.R. Plasma lipoprotein regulation of progesterone biosynthesis by human corpus luteum tissue in organ culture. *J. Clin Endocrinol Metab.* 52: 875, 1981.
- 8.- Carrel A. On the permanent life of tissues outside the organism. *J. Exp. Med.* 15: 516, 1912.
- 9.- Chegini N., Romani N. and Rao, Ch. V.: Morphological and biochemical characterization of small and large bovine luteal cells during pregnancy. *Mol Cell. Endocrinol.* 37: 89, 1984.

- 10.- Dharmarajan A.M., Yoshimura Y., Sueoka K., Atlas S.J., Dubin N.H., Ewing L.L., Zirkin B.R., Wallach E.E. Progesterone Secretion by corpora lutea of the isolated perfused rabbit ovary during pseudo pregnancy. *Biol. reprod.* 38: 1137, 1988.
- 11.- Dziadkowiec I., Warchol A., Jaworska B. Citado por Gegeraszczuk E. No. 24.
- 12.- Dorrington J.H., Moon Y.S., Armstrong D.T. Estradiol 17 β biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats: stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinol.* 97: 1328, 1975.
- 13.- Douglas W.H.J., Mc Ateer, Dell'Orco R.T., Phelps D. Visualization of cellular aggregates cultured a three-dimensional collagen Sponge Matrix. "In Vitro". 16: 306, 1980.
- 14.- Einspanier R., Miyamoto A., Schams D., Muller M., Brem G. Tissue concentration M RNA expression and stimulation of 1GF-1 in luteal Tissue during the oestrus cycle and pregnancy cows. *J. Reprod Fert* 90: 439, 1990.
- 15.- Elbaum J., David and Landis Keyes. Synthesis of 17 B Estradiol by isolated ovarian tissues of pregnant rat: Aromatization in the corpus luteum. *Endocrinol.* 99: 573, 1976.
- 16.- Fell Dame H. Citado por Sharp J.A. en *Introducción al cultivo de tejidos animales*. Ed. Omega. 1: 6, 1980.
- 17.- Fortune J.E., Wissler R.N. and Vincent S.E. Prolactin modulates steroidogenesis by rat granulosa cells II. Effects on estradiol. *Biol. Reprod.* 35: 92, 1986.
- 18.- Freshney Ian R. *Organ culture. Second Edition. Culture of animal cells a manual of basic technique* P 298-305, 1987.
- 19.- Fritz, Marc. A., Speroff Leon. The endocrinology of menstrual cycle: The interaction of folliculogenesis and neuroendocrine mechanisms. *Fert. Steril.* 38: 509, 1982.
- 20.- Fujita Y., Mori T., Akira S., Kenji N., Nishimura T. Functional and structural relationships in steroidogenesis in vitro by human corpora lutea during development and regression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 4: 747, 1981.

- 21.- Feher S., Ivell R., Koll R., Schams D., Fields M. Expression of the oxytocin gene in the large cells of the bovine corpus luteum. *FEBS Lett.* 210: 45, 1987.
- 22.- Gadsby J.E., Lancaster M.E. Rabbit placental-conditioned medium stimulates progesterone accumulation by granulosa-lutein cells in culture: preliminary characterization of a placental luteotropic hormone. *Biol. reprod.* 40: 239, 1989.
- 23.- Grazul-Bilska At., Redmer D.A., Killilea S.D., Kraft K.C., Reynolds L.P. Production of mitogenic factor (s) by ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Endocrinology* 130: 3625, 1992.
- 24.- Gregoraszczyk E. Progesterone and androgen secretion by isolated cultured bovine corpus luteum cells: Effect of hCG, PRL, Estradiol 17B and testosterone. *Histochem Cytobiol.* 23: 11, 1985.
- 25.- Greenwald G. S. Distribution between developing reserve follicles in the cycling hamster. *Ann Biol. Anim Bioch. Biophys.* 13: 199, 1973.
- 26.- Hakan Billing, Akihiko Kumai, Sten Rosberg. Adenosina receptor-mediated effects on adenylyl cyclase activity in rat luteal tissue: A putative local regulatory role of adenosina in the corpus luteum. *Biol. of Reprod.* 40: 102, 1990.
- 27.- Hauschka S.D. The influence of collagen on the development of muscle clones. *Proc. Natl Acad. Sci U.S.A.* 55: 119, 1966.
- 28.- Hickey G.J. "In vitro" synthesis of low molecular weight lipid-soluble luteotropic factor by conceptuses of cows at day 13-18 pregnancy. *Reprod fertil* 80: 569, 1987.
- 29.- Hoyer P., Keyes L.P., Gordon Niswender. Size distribution and hormonal responsiveness of dispersed rabbit luteal cells during pseudo pregnancy. *Biol. Reprod.* 34: 905, 1986.
- 30.- Hsueh A.J.W., Adashi E.Y., Jones P.V.C., Welsh Y.H. Hormonal regulation of differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrinol. Rev.* 5: 76, 1984.

- 31.- Hunter M.G., Southee J.A., Lamning G.E. Function of abnormal corpora lutea "in vitro" after Gm Rh - induced ovulation in the anoestrous ewe. *J. Reprod fertil* 84: 139, 1988.
- 32.- Illingworth D.R., Corbin D.K., Kemp E.D., Keenan E.J. *Hormone changes during the menstrual cycle in abeta lipoproteinemia reduced luteal phase progesterone in a patient with homo zygous hipo beta lipo proteinemia. Proc. Natl Acad. Sci U.S.A.* 79: 6685, 1982.
- 33.- Ito S. and Karnovsky M. Formaldehyde-glutaraldehyde fixative containing trinitro compounds. *J. Cell. Biol.* 39: 168, 1968.
- 34.- Jones S.G., Colston A.W. The structure and function of the corpus luteum. *Clin. in obstet. Gynecol.* 3: 43, 1976.
- 35.- Keyes P.L. and Witbank M.C. Endocrine regulation of the corpus luteum. *Ann. Physiol.* 50: 465, 1988.
- 36.- Lamy E., Ribes C., Canivenc R. Behavior of corpus luteum taken from European Badger Meles-Meles during the inactive luteal phase in organ culture. *Seances Soc. Biol. Fil.* 176: 171, 1982.
- 37.- Lehninger L.A. *Bioquímica de las bases moleculares de la estructura y función celular.* Ediciones Omega. 29: 822, 1981.
- 38.- Leighton J.A. A sponge matrix method tissue culture formation or organized aggregates of cells in vitro. *J. Natl Cancer Inst.* 12: 545, 1951.
- 39.- Lemon M., Mauleon P. Interaction between two luteal cell types from the corpus luteum of the sow in progesterone synthesis in vitro. *J. Reprod. Fert.* 64: 315, 1982.
- 40.- Liu Y.X., Hsueh A.J.W. Synergism between granulosa and theca-interstitial cells in estrogen biosynthesis by gonadotropin treated rat ovaries: Studies on the two cells, two gonadotropin hypotesis using steroid antisera. *Biol. Reprod.* 35: 27, 1986.
- 41.- Maklis J.D., Sidman R.L., Shine H.D. Cross linked collagen surface for cell culture that is stable, uniform and optically superior to conventional surfaces. *"In vitro"* 21: 189, 1985.

- 42.- Mass S., Jarry H., Teichman A., Roth W, Kohn W., Wittke W. Paracrine actions of oxytocin, prostaglandin F2 alpha, and estradiol within the human corpus luteum. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 74: 306, 1992.
- 43.- Mc Allister J.M., Mason J.I., Byrd W., Trant J.M., Waterman M.R., Simpson E.R. Proliferating human granulosa-lutein cells in long term monolayer culture: expression of aromatase, cholesterol side-chain cleavage, and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71: 26, 1990.
- 44.- Mc Natty K.P. The ovary. A correlation of structure and function in mammals. University of California Press. P. 44, 1980.
- 45.- Mc Natty K.P., Makris A., De Grazia C., Rian K.J. The production of progesterone, androgens and estrogens by granulosa cells, thecal tissue and stromal tissue from human ovaries "in vitro". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49: 687, 1979.
- 46.- Mesaki N., Usuki S., Kubat, Iwasaki H. The direct effect of prostaglandin Psub 2 (alpha) on corpus luteum "in vitro". *Folia Endocrinol* 57: 837, 1981.
- 47.- Miyamoto A., Okuda K., Schweigert F.J., Schams D. Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor - B and nerve growth factor on secretory function of bovine corpus luteum "in vitro" *J. Endocrinol.* 135: 103, 1991.
- 48.- Moon Y.S., Dorrington H.J., Armstrong T. Stimulatory action of follicle stimulating hormone on estradiol 17B secretion by hypophysectomized rat ovaries in organ culture. *Endocrinol.* 97: 244, 1975.
- 49.- Moon Y.S., Tsang B.K., Simpson C. 17B- estradiol biosynthesis in cultured granulosa and thecal cells of human ovarian follicles: stimulation by follicle stimulating hormone. *J. Clin. Endocrinol* 47: 263, 1978.
- 50.- Moon Y.S. The role of gonadotropins and testosterone in progesterone production by human ovarian granulosa cells. *Mol. and Cell. Endocrinol.* 23: 115, 1981.
- 51.- Mori. T., Nihnobu K., Takeuchi S., Onho Y., Tojo S. Interrelation between luteal cell types in steroidogenesis in vitro of human corpus luteum. *J. Steroid Biochem.* 19: 811, 1983.

- 52.- Nelson S.E., Mc Lean M.P., Jayatilak P.G., Gibori G. Isolation characterization and culture of cell subpoblations forming the pregnant rat corpus luteum. *Endocrinol.* 132: 954, 1992.
- 53.- Oxberry A.B. and Greenwald S.G. Autoradiographic analysis of proestrous changes in the binding of ¹²⁵I-labeled prolactin to hamster ovary. *Biol. Reprod.* 29: 1255, 1983.
- 54.- Rajanemi H., Vanha-Perttula T. Attachment to luteal plasma membranes: An early event in the action of luteinizing hormone. *J. Endocrinol.* 57: 199, 1973.
- 55.- Redmer D.A., Grazul-Bilska A.T., Reynolds L.P. Contact-dependent intercellular communication of bovine luteal cells in culture. *Endocrinol.* 129: 2557, 1991.
- 56.- Richardson M.C., Davies D.W., Watson R.H., Dunsford M.L., Inman C.B., Masson G.M. Cultured human granulosa cells as model for corpus luteum function: relative roles of gonadotrophin and low density lipoprotein studied under defined culture conditions. *Hum. Reprod.* 7: 8, 1992.
- 57.- Rodger R.J., O'Shea J.D. Purification, morphology and progesterone content of three cell types isolated from the corpus luteum of the sheep. *J. Biol. Sci.* 35: 441, 1982.
- 58.- Rodger R.J., O'Shea J.D., Findlay J.K. Do small large luteal cells of the sheep interact in the production of progesterone? *J. Reprod. Fert.* 75: 85, 1985.
- 59.- Rotchild I. The regulation of the mammalian corpus luteum *Recent Prog. Horm. Res.* 37: 230, 1981.
- 60.- Sepúlveda S.J., Velázquez B., Quesada R., Nufiez A., Vazquez D. In vitro organogenesis and differentiation of fetal lung rudiments grown in chamber slide. *In vitro* 22: 27, 1986.
- 61.- Sharp J.A. Introducción al cultivo de tejidos animales. Ediciones Omega. 2: 16, 1980.
- 62.- Schwall R.H., Gamboni F., Mayan M.H., Nisswender G.D. Changes in the distribution of sizes of ovine luteal cells during the estrous cycle. *Biol. Rep.* 34: 911, 1986.

63.- Simpson E.R., Rochelle D.B., Carr B.R., Macdonald P.C. Plasma lipoprotein in follicular fluid of human ovaries. *J. Clin. Endocrinol & metab.* 51: 1469, 1980.

64.- Sorour O., Raafat M., E.L. Bolkainy, Mohamad R. Infiltrative potentiality of brain tumors in organ culture. *J. Neuro Surg.* 43: 729, 1975.

65.- Stouffer R.L. Función y disfunción del cuerpo luteo *Clin. Obs. y Ginecológicas.* 3: 649, 1990.

66.- Tsai M.G. Gene transcription in nuclei and chromatin 7:27, department of cell biology, Baylor College of Medicine Texas Medical Center Houston Texas, 1980.

67.- Tsang B.K., Moon Y.S. Androgen biosynthesis in human ovarian follicles cellular source, gonadotropic control, and adenosine 3'5' monophosphate mediation. *J. Clin. Endocrinol. and Metab.* 48: 153, 1979.

68.- Voutilainen R., Taponainen J., Chung B.C., Matteson K., Miller W.L. Hormonal regulation of P450 (20, 22 desmolasa) and P450 C17 (17a-hydroxylase 7, 20 lyase) in cultured human granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63: 202, 1985.

69.- Wolff E. Determination de la differentiation sexuelle de la syrinx du canard cultive "in vitro". *Bull. Biol.* 86: 325, 1952.

70.- Yuh K.C.M., Possley K.M., Brabec M.K., Keyes P.L. Steroidogenic and morphological characteristics of granulosa and thecal compartments of the differentiating rabbit corpus luteum in culture. *J. Reprod. Fertil.* 76: 267, 1986.

APENDICE

TABLA I

mg D.N.A.	Absorbancia valor \bar{X}
0	0
5	0.2
10	0.39
15	0.59
20	0.8
25	1.05

En esta tabla se muestran los mg de D.N.A. standard y el valor medio de la absorbancia de los mismos, con el que se elaboró curva de calibración fig. I

CURVA DE CALIBRACION

Para Cuantificación de D.N.A.

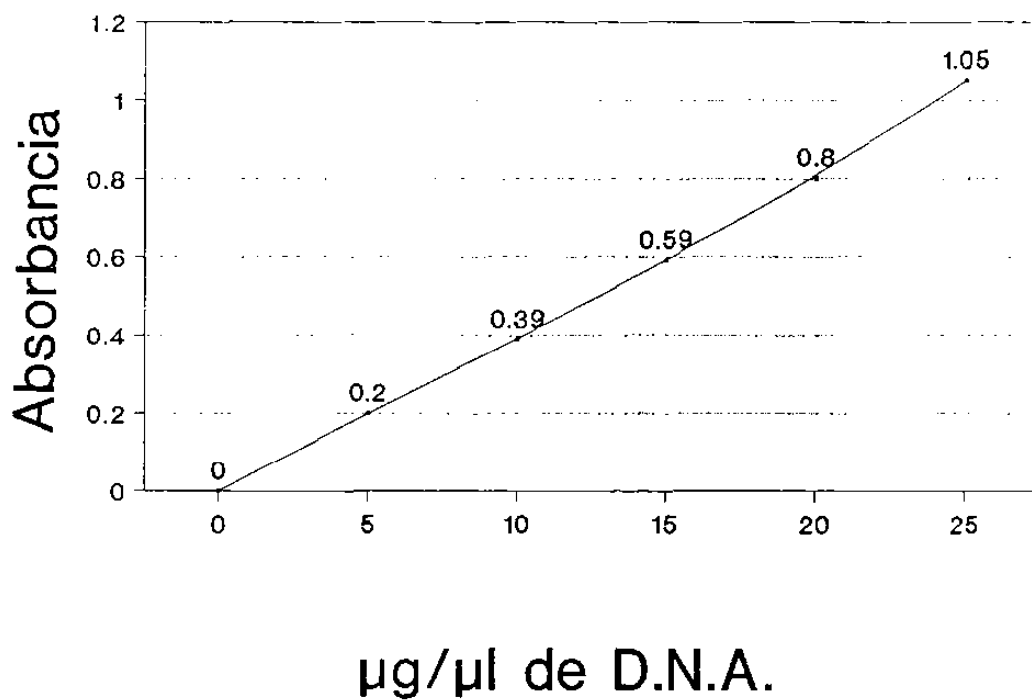


Fig. I. Con los datos de la Tabla I se elaboró esta curva

TABLA II

TIEMPO	CONDICIONES DE CULTIVO	MICROGRAMOS DE D.N.A.	\bar{X} MEDIA
24 hrs	con Gelfoam	18.4	18
		17.2	
		18.4	
	sin Gelfoam	17.6	
		17.4	
		18.9	
48 hrs	con Gelfoam	18.6	18.6
		18.2	
		18.0	
	sin Gelfoam	18.9	
		18.4	
		17.2	
72 hrs	con Gelfoam	18.6	17.9
		17.4	
		17.8	
	sin Gelfoam	18.2	
		18.65	
		18.4	

En esta tabla se muestra el peso en μg de D.N.A. de cada uno de los explantes en los tres tiempos y bajo las dos condiciones de cultivo.

Tomando en cuenta que el reporte hormonal de laboratorio R.I.A. se hace en unidades hormonales por mililitro, hubo necesidad de ajustar al volumen de la fosa de cultivo correspondiente a .4 ml (tabla II y III).

Valores de Estradiol (E) reportados por el RIA.

Tabla III

24 horas			
Con Gelfoam		Sin Gelfoam	
pg/ml	pg/.4ml	pg/ml	pg/.4ml
916.14	366.4	749	299.6
933.00	373.2	811	324.4
940.00	376.0	736.9	294.76

48 horas			
Con Gelfoam		Sin Gelfoam	
pg/ml	pg/.4ml	pg/ml	pg/.4ml
68.26	27.30	67.83	27.132
74.34	29.73	62.09	24.836
70.40	28.20	62.95	25.18

72 horas			
Con Gelfoam		Sin Gelfoam	
pg/ml	pg/.4ml	pg/ml	pg/.4ml
305.1	122.0	135.4	54.16
317.5	127.0	138.43	55.37
301.6	120.64	141.4	56.56

En esta tabla se muestran los valores de Progesterona (P) reportados por el RIA.

Tabla IV

24 horas			
Con Gelfoam		Sin Gelfoam	
ng/ml	ng/.4ml	ng/ml	ng/.4ml
0.0500	0.0200	0.0810	0.0324
0.0460	0.0184	0.0780	0.0312
0.0480	0.0912	0.0740	0.0296

48 horas			
Con Gelfoam		Sin Gelfoam	
ng/ml	ng/.4ml	ng/ml	ng/.4ml
0.0375	0.0150	0.0380	0.0152
0.0400	0.0160	0.0400	0.0160
0.0417	0.0166	0.0412	0.0164

72 horas			
Con Gelfoam		Sin Gelfoam	
ng/ml	ng/.4ml	ng/ml	ng/.4ml
0.760	0.304	0.660	0.264
0.840	0.336	0.710	0.284
0.790	0.316	0.680	0.272

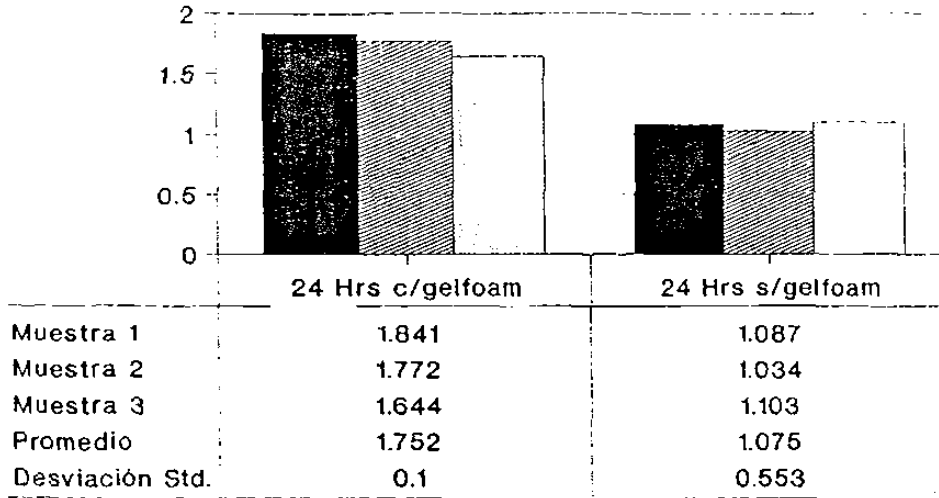
Tabla V

TIEMPO	CONDICIONES DE CULTIVO	ESTROGENOS (E2) pg/ μ S DNA		PROGESTERONA pg/ μ g DNA	
24 hrs	con Gelfoam	19.916	\bar{X}	1.8409	\bar{X}
		20.966	20.8270	1.772	1.752
		21.605		1.644	
	sin Gelfoam	17.02	\bar{X}	1.0869	\bar{X}
		18.43	17.27	1.033	1.0745
		16.37		1.103	
48 hrs	con Gelfoam	1.500	\bar{X}	0.872	\bar{X}
		1.670	1.596	0.898	0.895
		1.540		0.916	
	sin Gelfoam	1.4355	\bar{X}	0.804	\bar{X}
		1.3955	1.3995	0.898	0.865
		1.3680		0.895	
72 hrs	con Gelfoam	6.63	\bar{X}	16.70	\bar{X}
		6.86	6.65	18.01	17.29
		6.48		17.17	
	sin Gelfoam	2.97	\bar{X}	14.34	\bar{X}
		2.96	3.0	15.35	14.77
		3.07		14.62	

En base a los resultados expuestos en la tabla V se elaboró el diagrama en barras donde se agrega la desviación standard (std) de los mismos.

PROGESTERONA

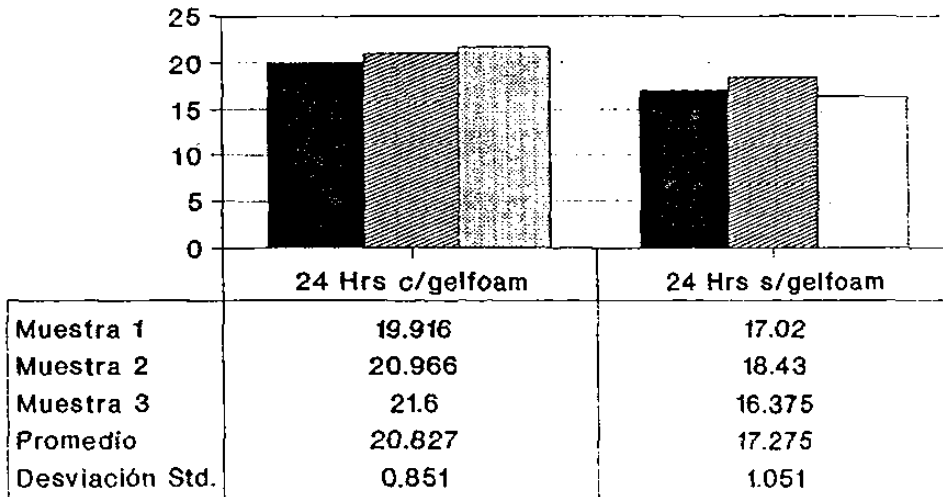
picogramos de hormona/microgramos DNA



■ Muestra 1 ▨ Muestra 2 □ Muestra 3

ESTRADIOL

picogramos de hormona/microgramos DNA

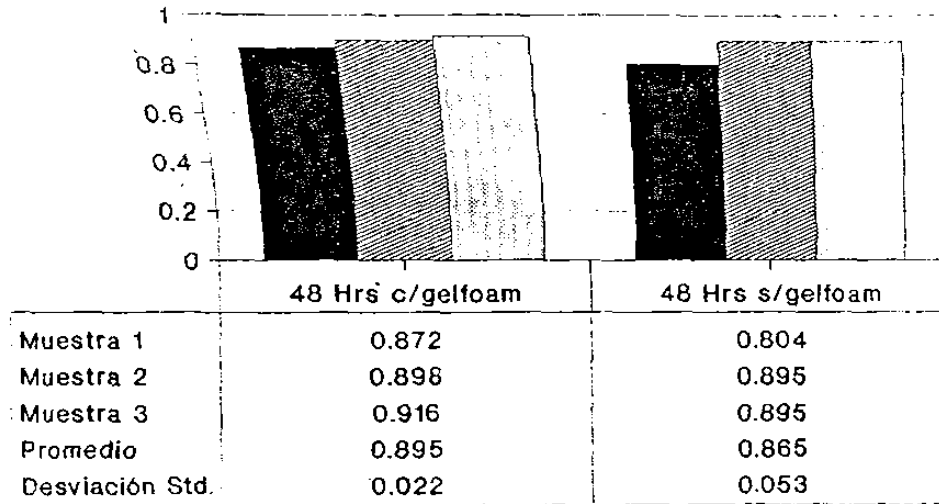


■ Muestra 1 ▨ Muestra 2 □ Muestra 3

Fig. 2.- Gráfica que muestra la producción de hormona por el explante expresados en pg de hormona por μg de D.N.A. bajo las dos modalidades de cultivo durante las primeras 24 horas.

PROGESTERONA

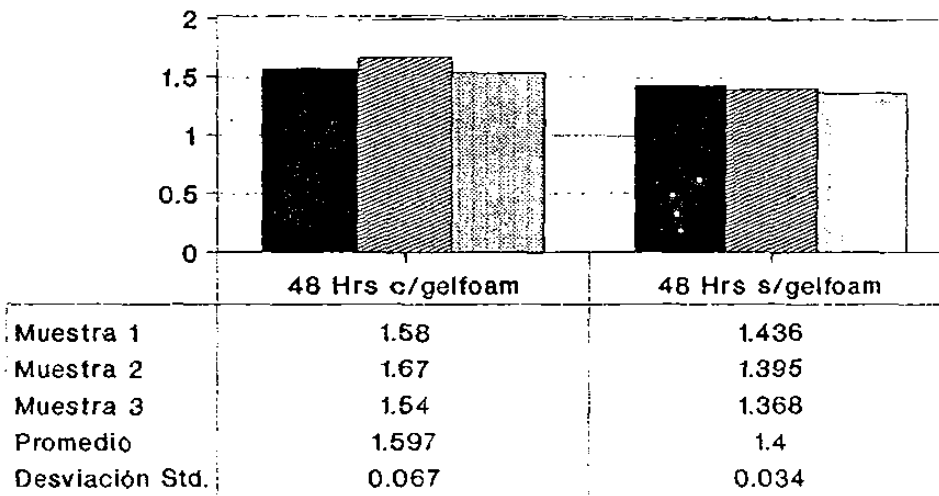
picogramos de hormona/microgramos DNA



Muestra 1
 Muestra 2
 Muestra 3

ESTRADIOL

picogramos de hormona/microgramos DNA

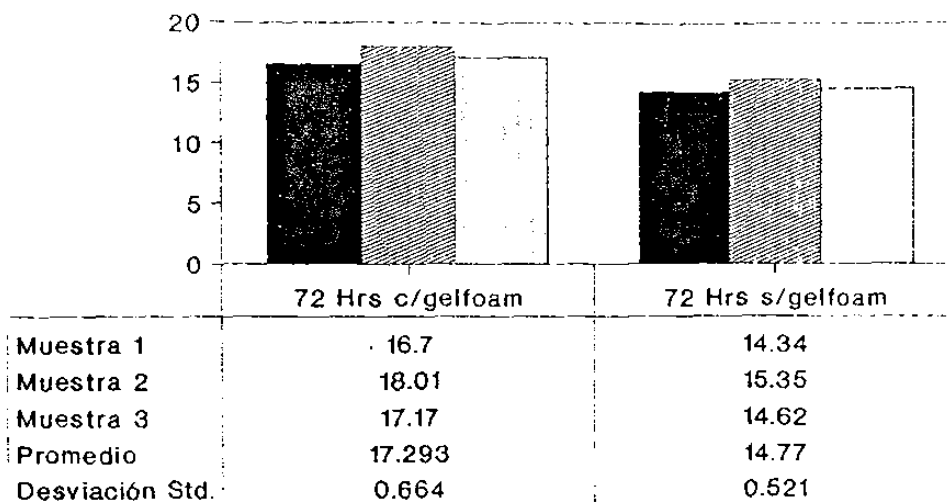


Muestra 1
 Muestra 2
 Muestra 3

Fig. 3.- Ilustración de la producción hormonal del explante correspondiente a las 48 horas de cultivo expresado en pg de hormona /mg de D.N.A.

PROGESTERONA

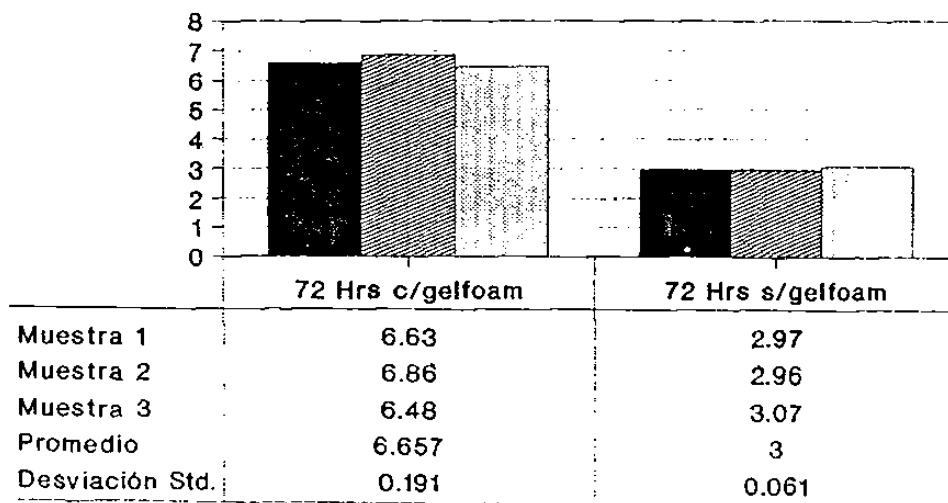
picogramos de hormona/microgramos DNA



■ Muestra 1 ▨ Muestra 2 □ Muestra 3

ESTRADIOL

picogramos de hormona/microgramos DNA



■ Muestra 1 ▨ Muestra 2 □ Muestra 3

Fig. 4.- Ilustración que muestra la funcionalidad del explante a las 72 horas de cultivo, la producción hormonal se expresa en pg de hormona por μg de D.N.A.

