



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**BIOSINTESIS DE ANDROGENOS EN LAS GONADAS  
FETALES EQUINAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A**

**FAUSTO SOLIS HERNANDEZ**

**MEXICO, D. F.**

**1 9 8 2**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## I N D I C E

	Página
<b>NOMBRES TRIVIALES, ABREVIATURAS Y NOMBRES SISTEMATICOS EMPLEA - DOS .....</b>	<b>I</b>
<b>I. INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS DEL ESTUDIO .....</b>	<b>20</b>
<b>III. MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>21</b>
- Hormonas Radiactivas .....	21
- Hormonas no Radiactivas .....	21
- Solventes .....	22
- Reactivos .....	22
- Material Biológico .....	22
- Preparación e Incuba - ción de los Tejidos .....	23
- Extracción, Purifica - ción e Identificación de los Metabolitos Ra- diactivos .....	24
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
<b>V. DISCUSION .....</b>	<b>39</b>
<b>CONCLUSIONES FINALES .....</b>	<b>43</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	

NOMBRES TRIVIALES, ABREVIATURAS Y NOMBRES

SISTEMATICOS EMPLEADOS

Testosterona (T)	17 $\beta$ -hidroxi-4-pregnen-3-ona.
Pregnenolona (P <sub>5</sub> )	3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona.
17 $\alpha$ -hidroxi-pregnenolona (17 $\alpha$ -OH-P <sub>5</sub> )	3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-5-pregnen-20-ona.
Progesterona (P <sub>4</sub> )	4-pregnen-3,20-diona.
20 $\alpha$ -hidroxi-progesterona (20 $\alpha$ -OH-P <sub>4</sub> )	20 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona.
Coolesterol	5-colesten-3 $\beta$ -ol.
Estradiol	1,3,5(10)-estrantrien-3,17 $\beta$ -diol.
Estrona	3-hidroxi-1,3,5(10)-estrantrien-17-ona.
Estriol	1,3,5(10)-estrantrien-3,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol.
Equlina	3-hidroxi-1,3,5(10),7-estran-tetraen-17-ona.
Equlinina	3-hidroxi-1,3,5(10),6,8-estran-penten-17-ona.
Androstendiona ( $\Delta^4$ -A)	4-androsten-3,17-diona.
Sulfato de pregnenolona	20-oxo-5-pregnen-3 $\beta$ -il-sulfato
17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona	17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen,3,20-diona.
17 $\alpha$ -20 $\alpha$ -hidroxi-progesterona	17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona.
Dehidrospirosterona (DEA)	3 $\beta$ -hidroxi-5-androsten-17-ona.
Sulfato de dehidrospirosterona.	17-oxo-5-pregnen-3 $\beta$ -il-sulfato.

3 $\beta$ -ol-deshidrogenasa	3 $\beta$ hidroxiesteroide: NAD(P) oxido-reductasa.
20 $\alpha$ -hidroxilasa	Esteroido NADP reducido:oxido-reductasa.
22 R-hidroxilasa	Esteroido, NADP reducido:oxígeno, oxido-reductasa (22 R-hidroxilación).
20,22-desmolasa	20,22 esteroide Liasa.
17 $\alpha$ -hidroxilasa	Esteroido, NADP reducido:oxígeno, oxido-reductasa (17 $\alpha$ -hidroxilación).
17,20-desmolasa	17,20-esteroide Liasa.
3 $\beta$ -sulfatasa	$\Delta^5$ -3 $\beta$ -hidroxiesteroide sulfatasa.
$\Delta^4$ - $\Delta^5$ -isomerasa	3-oxoesteroide- $\Delta^4$ - $\Delta^5$ -isomerasa.
17 $\beta$ -oxido-reductasa	17 $\beta$ -hidroxiesteroide:NAD(P) oxido-reductasa.
<b>Arcontasas</b>	
GCH	Gonadotropina coriónica humana.
PMSG	Gonadotropina de suero de yegua preñada.
Ci	Curie.
$\mu$ Ci	Microcurie.
dpm	Desintegraciones por minuto.
$\mu$ M	Micromolar.

## I. INTRODUCCION

La diferenciación sexual es uno de los fenómenos biológicos más trascendentes ya que asegura la perpetuación de las especies con reproducción sexual y es a la vez uno de los más complejos. Esta diferenciación existe a nivel de los cromosomas (sexo genético o cromosómico), de las gónadas (sexo gonadal), de los genitales internos y externos (sexo genital) y de la apariencia externa (sexo fenotípico). En efecto, el dimorfismo sexual es el resultado de una secuencia de eventos que ocurren en las fases más tempranas de la vida y cuya regulación presenta un alto grado de precisión. Debido a este dimorfismo en la mayor parte de las especies se pueden identificar o reconocer fácilmente dos sexos: el masculino y el femenino.

La determinación del sexo se establece en el momento de la fertilización y depende de la distribución de los cromosomas X e Y ó W y Z en el huevo. En muchas especies de vertebrados (mamíferos y en algunas de peces), la constitución genética es homogamética en la hembra (XX) y heterogamética en el macho (XY).

La diferenciación fenotípica incluyendo los genitales internos y externos es un evento posterior a la determi

nación del sexo genético y varía de acuerdo a las diferentes especies. En esta etapa, en los vertebrados, el embrión está provisto de los elementos rudimentarios e indiferenciados necesarios para la formación del aparato genital femenino o masculino y el proceso de diferenciación sexual se logra en base al estímulo o a la inhibición de esas estructuras genitales rudimentarias (1).

El proceso de diferenciación gonadal se basa en un intento continuo del blastema mesonéfrico de mantenerse en contacto con el blastema epitelial. Así en la gónada masculina se establece una fusión de ambos blastemas, mientras que en la gónada femenina se separan. Simultáneamente las células germinales primordiales migran de su sitio de origen (porción caudal y dorsal del saco vitelino) hacia la superficie medioventral del surco genital.

El proceso íntimo de diferenciación de la gónada indiferenciada a testículo u ovario embrionario no se ha dilucidado completamente. La teoría más aceptada es la de la asimetría cronológica propuesta por Jost y cols. (2) que plantea que la organización testicular es dirigida genéticamente por una substancia organizadora que actúa sobre la gónada primitiva, mientras que la ausencia de es-

te inductor condiciona que la gónada se desarrolle en una etapa más tardía como ovario.

Estudios recientes en la expresión del sistema H-Y indican que este antígeno de superficie es la substancia organizadora testicular y apoyan fuertemente esta teoría (3). En efecto, la presencia del antígeno H-Y induce la diferenciación de las células somáticas del surco genital en células de Sertoli, las cuales forman los cordones celulares que incorporan a las células germinales que migraron del saco vitelino. Las células de Sertoli regulan la actividad mitótica e inhiben el proceso meiótico de las células germinales durante la vida intrauterina siendo esta última actividad posiblemente regulada por las substancias inhibidora e inductora de la meiosis. La organización de los cordones inducida por el antígeno H-Y requiere de la presencia en estas células de un receptor membranal para este antígeno. Estos cordones celulares constituirán los túbulos seminíferos. Debe señalarse que la organización de túbulos es independiente de la presencia de células germinales.

Aunque la evidencia genética parece indicar que existe una clara relación entre la presencia de este antígeno y la diferenciación del testículo, el mecanismo por el

cual el antígeno H-Y llevaría a cabo la morfogénesis testicular, permanece altamente hipotético. En experimentos realizados in vitro en los que se ha intentado producir una reversión sexual de la gónada en reagregados celulares en presencia del antígeno H-Y y/o su antisuero, los resultados han sido sólo sugestivos. En efecto la observación de túbulos parecidos a los seminíferos y de agregados esféricos que recuerdan folículos en condiciones de cultivo aguardan aun estudios de alta resolución.

Por otra parte, es bien conocido el hecho de que usando hormonas esteroides sexuales exógenas es posible "inducir" epigenéticamente una reversión sexual de la gónada en casi todos los grupos de vertebrados inferiores e incluso en algunos mamíferos inferiores como los marsupiales.

Esta evidencia releva al antígeno H-Y como agente causal primario de la diferenciación sexual de la gónada en estas especies colocándolo como un factor evocado por la acción de las hormonas esteroides. Sin embargo, en los mamíferos debido al desarrollo embrionario intrauterino continuamente sometido a la acción potencial de las hormonas esteroides de la unidad feto-placenta-ma-

dre, la síntesis del antígeno H-Y parece haberse hecho constitutiva, de manera que su formación es independiente de la presencia o ausencia de hormonas esteroides sexuales. Esto explicaría el por qué en los mamíferos no se ha logrado la reversión sexual gonadal con hormonas esteroides, excepto en los marsupiales que nacen en una etapa muy temprana de su desarrollo.

El testículo embrionario se transforma en testículo fetal cuando se diferencian las células de Leydig a partir de células con aspecto de fibroblastos ubicadas en el intersticio de la gónada embrionaria. Este proceso de citodiferenciación se establece en la 8a y 9a semana de vida intrauterina. El testículo fetal dirige la diferenciación fenotípica masculina mediante los productos de secreción de dos de sus elementos fundamentales: la célula de Sertoli y la célula de Leydig.

El primer evento en la diferenciación genital masculina es la involución de los conductos Mülllerianos que se inicia entre la 8a y 9a semanas de la gestación y concluye en la 11a semana con la desaparición de este sistema. La regresión de los conductos Mülllerianos es mediada por una hormona fetal de origen testicular [4,5], la Hormona Inhibidora de Estructuras Mülllerianas (HIM), cuya na-

turalidad no ha sido aun esclarecida, sin embargo en estudios recientes se ha demostrado que se trata de una proteína con un peso molecular estimado por técnicas de centrifugación en gradientes entre 120,000 a 195,000 daltones [6]. Una serie de evidencias experimentales sugieren a la célula de Sertoli fetal como el sitio de biosíntesis de la HIM [7]. Se acepta que el efecto de esta hormona es local dado que en casi todas las situaciones fisiológicas y clínicas se requiere una cercanía anatómica entre el tejido testicular y los ductos Müllerianos para que ocurra la regresión.

La transformación de la gónada indiferente a ovario embrionario es más tardía (7a a 8a semana) que la observada en la diferenciación testicular y por otra parte no requiere una remodelación de los elementos de la gónada primitiva. Debido a la ausencia de factores organizadores o determinantes testiculares (sistema H-Y), las células de origen epitelial y mesonéfrico tienden inicialmente a separarse constituyendo un blastema cortical y un blastema gonadal. Sin embargo, la corteza ovárica fetal se forma por la combinación de células de origen mesonéfrico y epiteliales. La mayoría de las células germinales primordiales se incorporan en los cordones corticales (oogonias) que contienen células primitivas

de la granulosa. La transformación de ovario embrionario a ovario fetal ocurre en el momento en que las oogonias entran en profase meiótica (oocito primario). El proceso meiótico es regulado por las sustancias inductoras e inhibidoras producidas por las células de la granulosa. Estas células rodean a los oocitos formando una capa simple de células foliculares constituyendo el folículo primordial. Cuando el folículo primordial se rodea completamente de tejido conectivo se constituye el folículo primario, encontrándose los oocitos en estado de reposo. Este proceso de transformación requiere de la presencia de los dos cromosomas X activos. El número de oocitos alcanza su máximo ( $7 \times 10^6$ ) entre las semanas 18 a 22, disminuyendo progresivamente de tal manera que al momento del nacimiento solamente existen 2 millones de células germinales de las cuales la mitad muestra signos de degeneración.

El estudio de la naturaleza química de las sustancias producidas por las gónadas embrionarias, durante y después de la diferenciación sexual ha conducido a un gran número de investigaciones las cuales se han enfocado hacia tres aspectos principales: 1) La habilidad de la gónada embrionaria para sintetizar esteroides sexuales empleando precursores radiactivos; 2) el empleo de téc-

nicas histoquímicas para la localización de enzimas como la  $3\beta$ -ol deshidrogenasa involucradas en las vías biosintéticas de hormonas esteroides sexuales y 3) la demostración y caracterización de secreciones endógenas en las gónadas embrionarias.

La actividad biosintética de hormonas esteroides en las gónadas fetales difiere según se trate de la gónada masculina o femenina. Así mientras el testículo presenta gran actividad endócrina el ovario fetal es prácticamente inactivo.

En 1961 Acevedo y colaboradores [8] y Bloch en 1964 [9] realizaron los primeros experimentos que demostraron la capacidad del testículo fetal humano en diferentes etapas de la gestación para formar testosterona (T), empleando como substratos pregnenolona ( $P_5$ ),  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona ( $17\alpha$ -OH- $P_5$ ) y progesterona ( $P_4$ ) radiactivas. La mayor actividad de biotransformación del testículo se observó en los fetos entre la 7a y la 12a semana de gestación, coincidiendo con la etapa en que se realiza la diferenciación sexual de los genitales. Por otro lado, esta mayor actividad de las células de Leydig fetales coincide también con la mayor producción placentaria de gonadotropina coriónica humana (GCH), lo cual sugiere la

posibilidad de que esta gonadotropina sea la responsable del estímulo de las células intersticiales de la gónada masculina para la producción de la testosterona.

Posteriormente en 1970 [10] se informó la capacidad de biosíntesis "de novo" de testosterona por el testículo fetal humano de 14 semanas de gestación, demostrándose la presencia en este tejido de todas las enzimas necesarias para formar una hormona esteroide como la testosterona a partir de un compuesto no esteroide como es el acetato de sodio marcado con  $^{14}\text{C}$ .

Los datos anteriores demuestran como el testículo fetal del humano es capaz de biotransformar precursores esteroideos como de sintetizar "de novo" hormonas androgénicas de gran actividad biológica como la testosterona, que de acuerdo a la teoría de Jost es esencial para el desarrollo del fenotipo masculino.

A diferencia de lo informado respecto a la habilidad de biosíntesis de hormonas esteroideas por el testículo fetal, los estudios realizados con ovarios fetales tanto humanos como de otras especies muestran una muy escasa actividad en estos tejidos.

En 1964, Bloch [9] demostró que al incubar con progesterona  $^{14}\text{C}$  homogeneizados de tejidos ováricos fetales,

éstos solo fueron capaces de reducir la cetona en posición 20 formando 20 $\alpha$ -hidroxi-progesterona. Años más tarde Jungmann y Schweppe [11] al incubar ovarios de fetos humanos de 20 semanas de gestación con acetato de sodio marcado con  $^{14}\text{C}$ , encontraron la mayor parte de la radiactividad en la fracción de esteroides e identificaron completamente tanto el lanosterol como el colesterol formados. En la fracción correspondiente a los esteroides se encontraron solo huellas de radiactividad asociadas a los "acarreadores" de pregnenolona y progesterona.

La capacidad de aromatización de los ovarios fetales se estudió en experimentos de biosíntesis in vitro realizados en ovario fetal de bovino casi al final de la gestación demostrándose la formación de estradiol ( $\text{E}_2$ ) radiactivo a partir de androstendiona- $^{14}\text{C}$  ( $\Delta^4\text{-A}$ ) [12].

El conocimiento de la endocrinología de la unidad feto-placenta en el humano [13] puso de manifiesto el alto grado de conjugación a ésteres sulfatos de las hormonas esteroideas presentes en grandes concentraciones en la circulación fetal, tanto en el feto femenino como en el masculino [14]. Estas hormonas conjugadas pueden ser utilizadas por las suprarrenales [15] y las gónadas masculinas [16] como precursores en la biosíntesis de otros sulfatos de hormonas esteroideas. La conversión de estos sulfatos

a hormonas "libres" con actividad biológica, requiere previamente romper la unión del ester-sulfato por medio de enzimas llamadas sulfatasas, las cuales han sido demostradas en el testículo fetal humano en la etapa en que se lleva a cabo la diferenciación sexual [16] y en ovarios fetales humanos en las semanas 12 a 17 [17].

Jaffe y colaboradores [18] demostraron en estudios realizados in vitro, que el testículo fetal humano de la semana 16 a la 20 respondió con una máxima producción de testosterona ante la presencia de concentraciones fisiológicas de GCH.

Estos mismos autores [19], empleando un método de radioinmunoanálisis midieron la concentración de GCH en varios tejidos fetales, encontrando los niveles más altos en el ovario seguido por el riñón, el timo y el testículo. Aunque en la actualidad no se ha demostrado esteroidogénesis en el ovario fetal como respuesta a la estimulación con GCH, estos resultados sugieren una posible acción fisiológica de la hormona placentaria sobre este tejido.

Casi simultáneamente, el grupo del Dr. Wilson, demostró la conversión in vitro de andrógenos a estrógenos en los ovarios fetales del conejo [20] y del humano [21] en diferentes estadios de la gestación. En estos experimentos,

sin embargo, los ovarios de los fetos humanos menores de 3 cm y del conejo antes del día 18 así como los testículos de todas las edades, fueron incapaces de realizar la aromatización de los andrógenos.

La etapa en la que el ovario presenta esta capacidad enzimática de aromatización es semejante a la del testículo para producir testosterona, sugiriendo que la función endócrina de estos tejidos se desarrolla antes de la diferenciación histológica y que posiblemente sea regulada por factores similares durante el desarrollo embrionario.

Todos estos informes de la literatura demuestran la presencia de la mayoría de las enzimas necesarias para la biosíntesis de las hormonas esteroides con actividad biológica en las gónadas fetales de varias especies de mamíferos. En las Figuras 1 y 2 se describen las vías biosintéticas que han sido demostradas en ambas gónadas fetales.

Entre los mamíferos, el equino es una especie en la que el desarrollo de las gónadas fetales es en todos aspectos notablemente diferente. Durante el curso de la gestación las gónadas fetales se hipertrofian exageradamente de tal modo que alrededor de los 220 días el tamaño de estos órganos es mayor que el de los ovarios de la madre, los cuales a su vez, durante esta etapa involucionan, pe-

INTEGRACION DE LAS VIAS METABOLICAS DESCRITAS EN EL  
TESTICULO FETAL DE VARIAS ESPECIES DE MAMIFEROS

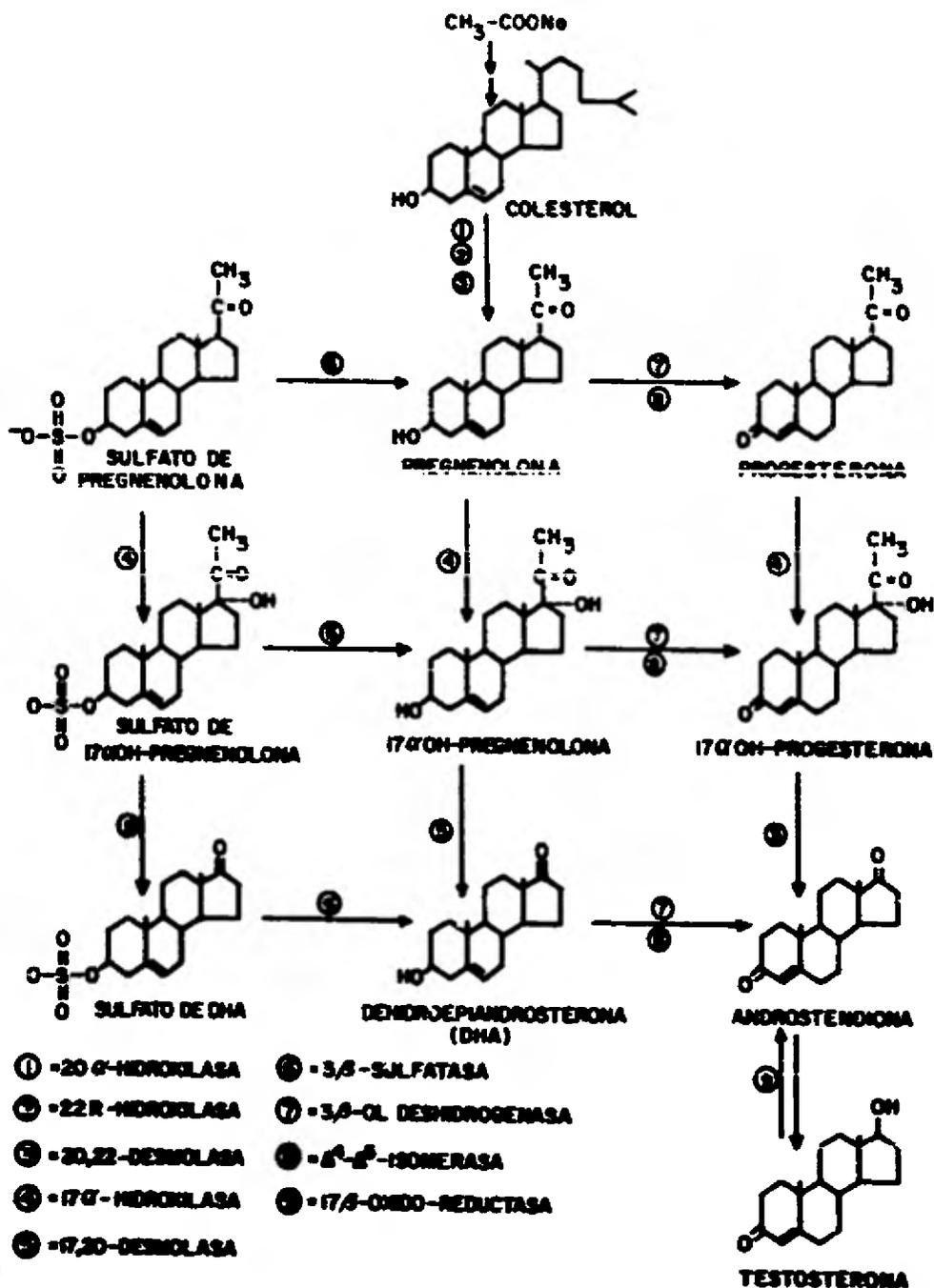


FIGURA 1

INTEGRACION DE LAS VIAS METABOLICAS DESCRITAS EN EL OVARIO FETAL DE VARIAS ESPECIES DE MAMIFEROS

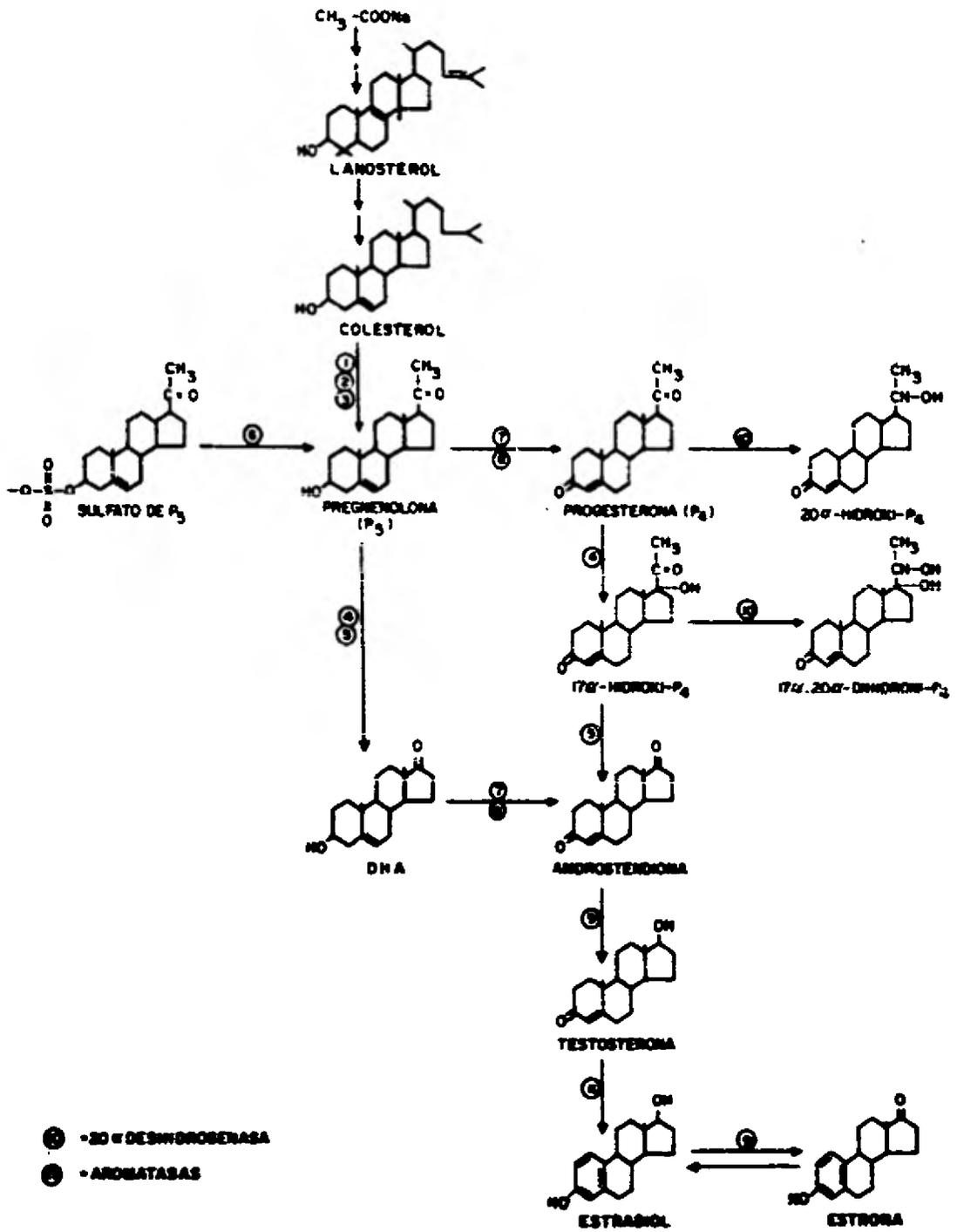


FIGURA 2

ro una subsecuente regresión a finales de la gestación hace que al momento del nacimiento las gónadas sean solo 1/8 del máximo tamaño alcanzado.

La primera mención de este hecho la realizó Aristóteles en la antigüedad al señalar que en el abdomen de los fetos del caballo se encontraban 4 riñones, ya que por el tamaño y el aspecto de las gónadas fetales estas son difícilmente identificadas como tales. Posteriormente, en el siglo XVI en la "Anatomía del Caballo" publicada por Carlos Ruini se hace énfasis también en la hipertrofia gonadal en los fetos.

Desde el punto de vista hormonal la gestación en la yegua también es diferente a la de otros mamíferos. A partir del día 45 existe en el suero de la yegua una hormona con actividad gonadotrópica (PMSG), la cual permanece en circulación hasta aproximadamente los 150 días de la gestación, alcanzando sus valores máximos entre los 50 y 80 [22].

Como consecuencia de las altas concentraciones de PMSG, los ovarios de la yegua presentan un marcado crecimiento folicular con frecuentes ovulaciones y formación de cuerpos lúteos que se mantienen produciendo progesterona hasta aproximadamente el día 100 en que inician su regresión.

Por otro lado, no existe ninguna relación entre la hipertrofia de la gónada fetal y la producción de la gonadotropina materna ya que cuando la gónada alcanza su máximo tamaño la PMSG ya no está presente en la sangre de la madre.

Aun con el empleo de técnicas de bioensayo no se pudo demostrar ninguna evidencia de actividad progestacional ni androgénica en los extractos de grandes cantidades de ovarios y testículos fetales, sin embargo, sí se encontró presente una gran actividad estrogénica en estos mismos extractos [23]. En el análisis cromatográfico de un extracto de tejido ovárico de un feto de equino de 4 meses de edad, tampoco se demostró la presencia de progesterona [24].

Los estrógenos más abundantes en el plasma de la yegua gestante son estrona, estradiol, equilina y en menor proporción equilinina, sin embargo, la presencia de estriol nunca ha podido ser demostrada.

La equilina y equilinina son compuestos aromáticos producidos exclusivamente por la yegua durante el embarazo y presentan a diferencia de los estrógenos clásicos, el anillo B insaturado con una doble ligadura en el átomo de carbón 7 en la equilina y dos dobles ligaduras en posición 6 y 8 en el caso de la equilinina.

Durante la gestación, los estrógenos presentan una elevación en sus niveles plasmáticos a partir del 4° mes, alcanzando un máximo entre los 150 a 200 días [25], período que coincide exactamente con la máxima hipertrofia de las gónadas fetales.

Los estrógenos equinos no se producen en el macho ni en la hembra no gestante, por lo que es posible concluir que estos compuestos insaturados en el anillo B sean formados por la unidad feto-placenta.

Los estudios realizados por Raeside y sus colaboradores [26] sobre el posible papel de las gónadas fetales en la producción de estrógenos, demostraron que después de practicar gonadectomía unilateral en el feto, independientemente de su sexo, los valores de los estrógenos urinarios de la madre disminuyen aproximadamente a la mitad en el día siguiente a la operación. Cuando la gonadectomía fetal fue bilateral, los niveles de estrógenos descendieron rápidamente en las 48 horas posteriores a la intervención y además un alto porcentaje de los embarazos culminaron en abortos inmediatos.

Como el contenido de estrógenos en el ovario o testículo fetal no es mayor que el del hígado o riñón [27], se considera que las gónadas fetales no son el sitio de formación de estrógenos sino que al igual que como ocurre

en el humano, éstos son sintetizados por la placenta que tiene una gran cantidad de acetatas, pero requiere de los sistemas enzimáticos presentes en el feto ya que es incapaz de biosintetizar compuestos C<sub>19</sub> (andrógenos) que son los precursores inmediatos de los estrógenos.

Este sería el mecanismo por el cual se sintetizarán estrógenos como la estrona y el estradiol, sin embargo, los estrógenos equinos no se forman a partir de los precursores utilizados en la biosíntesis de los estrógenos clásicos, sino que existe una vía que parte de un paso anterior a la formación de escualeno y que por lo tanto no involucra al colesterol como precursor obligatorio según lo han demostrado los estudios de Bhavnani y Short [28-31].

Los únicos estudios de biosíntesis de hormonas esteroideas en las gónadas fetales equinas se realizaron en testículos en la etapa de mayor hipertrofia [32]. En estos experimentos se demostró como las gónadas de un feto masculino de 9 meses poseen los sistemas enzimáticos necesarios para llevar a cabo la síntesis "de novo" de un gran número de esteroides, ya que después de haber incubado rebanadas del tejido testicular con acetato de sodio <sup>14</sup>C fue posible aislar e identificar colesterol 17α -

OH-progesterona, DHA, testosterona, androstendiona y estrona.

También en contraste con lo establecido acerca de la diferenciación sexual de los mamíferos, en las gónadas masculinas y femeninas del caballo, se observa desde estadios muy tempranos una diferenciación masiva de tejidos esteroideogénicos [33-35]. Recientemente Merchant-Larios [36] en un estudio muy completo sobre la morfogénesis y citodiferenciación de la gónada fetal del caballo, informó como en embriones de ambos sexos, de 1.5 cm de largo se inicia el proceso de citodiferenciación en la zona más compacta de la cresta genital, destacando un aumento en el número de mitocondrias con crestas tubulares así como un rápido desarrollo del retículo endoplásmico. Al estudiar embriones de 1.8 cm, se pudo observar un segundo estadio de diferenciación el cual es aparente en algunas células localizadas en la zona más profunda de la cresta genital (médula). En esta etapa, las mitocondrias aumentan de volumen, las crestas tubulares se hacen más abundantes y el gran desarrollo de las membranas cisternales inicia la formación activa del retículo endoplásmico liso.

En un tercer estadio, observado en embriones de 2 cm, las células adquieren la estructura típica de las célu-

las esteroidogénicas. Aunque este patrón de diferenciación es el mismo en todos los embriones estudiados, la distribución de las células productoras de esteroides varía según la gónada. En aquellas identificadas como testículos, la médula está separada del epitelio superficial por una invasión de tejido y vasos sanguíneos y las células esteroidogénicas siempre se observan separadas de los túbulos seminíferos. A diferencia de los testículos, los ovarios presentan un arreglo diferente de las células esteroidogénicas que están contenidas en un sistema único de cordones que se hacen más evidentes hacia la región cortical, donde se continúan con el epitelio superficial. En contraste también con el testículo, la lámina basal que rodea los cordones se interrumpe con frecuencia en la región medular.

En la corteza del ovario, las células somáticas que rodean a las células germinales presentan ya una clara diferenciación de células esteroidogénicas.

El siguiente paso en el desarrollo de la gónada, se observó en el embrión de 4 cm de largo y está caracterizado por un aumento significativo de la cantidad de tejido conectivo en ambas gónadas, el cual en el testículo va a separar los túbulos seminíferos de las células de Leydig.

En el ovario se observa una disgregación temporal de la médula así como una separación definitiva de los cordones corticales.

Finalmente, el cambio más importante que ocurre en los embriones de los 7.5 cm en adelante, es el extraordinario aumento en la cantidad del tejido esteroidogénico en el cual los túbulos seminíferos del testículo están completamente sumergidos, mientras que en el ovario los cordones epiteliales que contienen las células germinales están restringidos a una capa superficial delgada.

## II. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Siendo el caballo una especie tan peculiar y habiendo tan escasa información con respecto al desarrollo de sus gónadas fetales, se diseñó el presente estudio con el objeto de comprobar la actividad esteroidogénica presente tanto en el ovario como en el testículo del feto desde estadios muy tempranos de la diferenciación gonadal, y establecer las diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en los procesos de biosíntesis hormonal en las gónadas equinas de diferente sexo y edad de gestación.

El empleo de pregnenolona-<sup>3</sup>H, un precursor de esteroides biológicamente activos, nos permitirá establecer la presencia de las actividades enzimáticas en las diferentes gónadas estudiadas.

La demostración de que el ovario fetal no es un órgano pasivo desde el punto de vista de la esteroidogénesis durante la etapa fetal, podría cambiar totalmente las teorías tradicionales acerca del papel del testículo como único responsable de la inducción de la diferenciación fenotípica en los vertebrados.

### III. MATERIAL Y METODOS

#### MATERIAL:

#### 1. Hormonas Radiactivas.

Se empleó Pregnenolona marcada con tritio en el carbon 7, con una actividad específica (A.E.) de 17.2 Curies/mmola, la cual se obtuvo de la Cia. New England Nuclear de Boston, Massachusets. Esta pregnenolona radiactiva se repurificó por partición cromatográfica en papel en el sistema A, el cual se describe en la Tabla I.

La pureza radioquímica de este compuesto se estableció al recristalizar una alícuota con pregnenolona pura no radiactiva hasta alcanzar una A.E. constante.

#### 2. Hormonas no Radiactivas.

Las hormonas esteroides no radiactivas que se utilizaron fueron: pregnenolona, progesterona, dehidroepiandrosterona, androstendiona, testosterona, estrona y estradiol. Estos compuestos se obtuvieron de Steraloids Inc. y de Sigma Chemical Co. Todos ellos se analizaron por espectroscopía en infrarrojo después de recristalizarse varias veces en metanol y de determinar su punto de fusión.

T A B L A I

SITEMAS DE CROMATOGRAFIA DE PARTICION EN PAPEL

SISTEMA	COMPOSICION	PROPORCION
A	LIGROINA : PROPILENGLICOL *	1:1
B	TOLUENO : PROPILENGLICOL *	1:1
C	HEPTANO : METANOL : AGUA **	5:4:1
D	HEPTANO : BENCENO:METANOL:AGUA **	6.6:3.3:8:2
E	ISOOCTANO : TOLUENO:METANOL:AGUA **	2.5:7.5:8:2

\* Sistemas tipo Savard.

\*\* Sistemas tipo Bush.

3. Solventes.

Solventes como heptano, tolueno, benceno, metanol, etanol, diclorometano, cloroformo, propilenglicol y ligroina (eter de petróleo 30-60 °C) fueron de grado analítico y se destilaron inmediatamente antes de usarse.

4. Reactivos.

Todos los reactivos empleados fueron también de grado analítico.

5. Material Biológico.

Se utilizaron las gónadas de fetos machos y hembras de equinos, en diferentes estadios de la gestación, los cuales se obtuvieron por medio de laparotomía practicada a las yeguas preñadas inmediatamente después de ser sacrificadas en un rastro de equinos.

El tiempo de la gestación se estableció de acuerdo al tamaño y características de los fetos según lo descrito por Roberts (Tabla II).

Los tejidos gonadales se depositaron sobre hielo para ser transportados al laboratorio y procesados en un tiempo no mayor de 60 minutos después de haberse extraído.

T A B L A II

RELACION DEL TAMAÑO Y CARACTERISTICAS FETALES DEL EQUINO CON LA EDAD GESTACIONAL\*

DIAS DE GESTACION	LONGITUD CABEZA - ANCA (cm)	CARACTERISTICAS DEL FETO
30	0.9 - 1.0	APARICION DE LAS EXTREMIDADES. SE HACEN APARENTES - LOS OJOS Y LA BOCA.
50	3.0 - 3.5	APARECEN LOS PARPADOS Y LAS OREJAS.
90	10 - 14	SE FORMAN LOS PEZONES Y LAS PEZUÑAS.
120	15 - 20	FORMACION DE LOS GENITALES EXTERNOS. ESCROTO VACIO .
240	60 - 80	CRECIMIENTO DEL PELO DE LA CRIN Y LA COLA.
330	100 - 150	CUERPO TOTALMENTE CUBIERTO POR EL PELO CON SU COLOR DEFINITIVO. DESCIENDEN - LOS TESTICULOS.

\* Tomado de: *Veterinary Obstetrics and Genital Diseases.*  
Roberts, S.J. Edward, Bros. Eds. Nueva York  
1971, p. 27.

METODOS:

1. Preparación e Incubación de los Tejidos.

Las gónadas fetales femeninas y masculinas se pesaron en una electrobalanza Mettler Modelo S6. De las gónadas de los fetos mayores se tomó sólo una porción de aproximadamente 5g mientras que las más pequeñas se utilizaron completas procediendo a preparar e incubar los tejidos como a continuación se describe:

Los tejidos gonadales se fragmentaron finamente por medio de una tijera, de este modo, al mismo tiempo que se mantiene la integridad celular se aumenta la superficie de exposición al medio de incubación. Durante todo este proceso, los tejidos se mantuvieron a una temperatura de 4 °C con objeto de preservar la actividad enzimática.

Los fragmentos tisulares se colocaron en matraces Erlenmayer de 25 ml, los cuales contenían 5  $\mu$ Ci de la pregnenolona-<sup>3</sup>H a dos diferentes concentraciones: 0.05  $\mu$ M ó 0.5  $\mu$ M en solución de Krebs-Ringer de fosfatos a un pH de 7.4 en un volumen final de 5 ml. No se emplearon coenzimas y los controles del experimento contenían todos los elementos descritos menos el tejido (Tabla III).

T A B L A III

## DATOS FETALES Y EXPERIMENTALES

Experimento No.	Sexo Fetal	Longitud Cabeza-Ancas (cm)	Edad Estimada (días)	Peso de la Gónada (g)	Peso del Tejido Incubado (g)	Pregnenolona- <sup>3</sup> H Incubada 5 $\mu$ Ci ( $\mu$ g)
1	♀	11	90	0.10	0.10	0.05
2	♀	80	270	18.95	4.49	0.05
3	♂	75	260	23.58	4.81	0.05
4	♂	80	270	22.45	4.87	0.05
5	♀	11	90	0.10	0.10	0.50
6	♀	80	270	18.99	6.28	0.50
7	♂	75	260	22.60	5.87	0.50
8	♂	80	270	21.49	5.44	0.50

La incubación se llevó a cabo en un incubador metabólico Dubnoff Modelo MFG, con agitación constante, a 37.5 °C por 3 horas y con una atmósfera de oxígeno (95%) y bióxido de carbono (5%). Una vez finalizado el tiempo de la incubación y con objeto de parar la actividad enzimática se agregaron a cada matraz 5 ml de diclorometano saturado con agua y se congeló posteriormente el sistema en un baño de hielo seco y acetona. Los matraces se mantuvieron en congelación hasta el momento de homogeneizar los tejidos, para lo cual se emplearon homogeneizadores de vidrio de tipo Potter-Elvehjem.

2. Extracción, Purificación e Identificación de los Metabolitos Radiactivos.

Los metabolitos radiactivos formados durante la incubación se extrajeron de los tejidos homogeneizados mediante una partición con 30 ml de diclorometano saturado con agua en tubos de centrifuga de fondo redondo de 50 ml y con tapón esmerilado, repitiendo el proceso por 5 veces. La fase orgánica (diclorometano) se colectó en matraces de fondo redondo haciendo pasar a través de sulfato de sodio anhidro con objeto de eliminar el agua presente. Una vez terminadas las extracciones, el solvente orgánico se evaporó a sequedad por medio de un evaporador rotatorio

con vacío Büchi modelo R/A. El extracto seco se re-disolvió en 10 ml de metanol y se tomaron alícuotas por triplicado de 1/200 del volumen, para determinar el contenido de tritio en un Espectrómetro de Centelleo Líquido, Packard Modelo 2660. Cada alícuota se disolvió en 10 ml de una solución de centelleo, la cual se preparó con 4g de PPO (2,5-difenil-oxazol) y 200 mg de dimetil-porcor (1,4-bis-2(4-metil-5-fenil-oxazolil)-benceno) disueltos en 1000 ml de tolueno de grado de centelleo.

De la fase acuosa se tomó una alícuota de 1/10 del volumen, la cual se incorporó a 10 ml de una solución de Instagel (Packard Instrument Co. Inc.) que es una mezcla especial capaz de incorporar agua al sistema de centelleo.

Para todas las muestras en las que se cuantificó el contenido de tritio se utilizaron tubos especiales de vidrio con bajo contenido de  $^{40}\text{K}$  ya que este radio-núclido tiene una energía similar a la del tritio lo cual incrementaría las cuentas de fondo. El tiempo en que se contaron las muestras fue el adecuado para asegurar un error no mayor del 5%.

Con el objeto de separar los lípidos que pudieran interferir posteriormente en los procesos de purifica

ción de los esteroides radiactivos formados, los extractos orgánicos fueron disueltos en 5 ml de metanol acuoso (90%) saturado con heptano y reextraídos por 3 veces con un volumen igual de heptano saturado a su vez con metanol acuoso.

Nuevamente después de esta partición se tomaron alícuotas de cada fase (1/200) para determinar el contenido de radiactividad en cada una de ellas.

El método empleado para la purificación e identificación de cada uno de los metabolitos radiactivos formados fue el de dilución isotópica, el cual incluyó: dilución de la actividad específica, determinación de la movilidad cromatográfica, por lo menos en 2 sistemas diferentes de cromatografía de partición en papel y recristalizaciones sucesivas hasta demostrar una actividad específica constante.

A continuación se describirán en detalle cada uno de los procesos mencionados.

#### A. Dilución de la Actividad Específica.

La actividad específica de un compuesto marcado isotópicamente, se define como la cantidad de radiactividad por unidad de masa.

Por lo tanto y de acuerdo a las concentraciones de la pregnenolona-<sup>3</sup>H empleada como precursor en estos estudios biosintéticos, los productos metabólicos obtenidos poseen una masa insignificante que se encuentra en el orden de los picogramos, siendo imposible el empleo de las técnicas habituales para establecer su estructura química, por lo cual, se utilizaron métodos indirectos como es la dilución de la actividad específica original, agregando cierta cantidad de esteroides no radioactivos que servirán también como acarreadores específicos de los diferentes compuestos formados.

El aumento en la masa nos permitió localizar a los metabolitos no sólo por la detección de la radiactividad, sino también por reacciones de algunos de los grupos funcionales característicos con reactivos específicos o bien por algunas propiedades físicas como es la absorción de luz ultravioleta.

La dilución de la actividad específica de los metabolitos radiactivos presentes en los extractos metanólicos libres de lípidos se realizó agregando 200 µg de cada uno de los siguientes este-

roides no radiactivos: pregnenolona, progesterona, dehidroepiandrosterona, androstendiona, testosterona, estrona y estradiol.

B. Determinación de la Movilidad Cromatográfica.

El método de cromatografía de partición en papel que se basa en la distribución del esteroide en relación con su coeficiente de partición en dos fases formadas por solventes no miscibles y de diferente polaridad, fue el que se empleó en el presente trabajo para separar y purificar la mezcla de los metabolitos esteroides obtenidos después de la incubación.

Los sistemas cromatográficos utilizados fueron diseñados por Bush [37] y Savard [38] y se describen en la Tabla I. El primero de ellos, emplea en la constitución de la fase fija o estacionaria solventes muy polares y volátiles, de modo que la impregnación del papel con esta fase se realiza dentro de la cámara de cromatografía. En cambio, los sistemas de Savard difieren en que en la fase estacionaria se utiliza un solvente de alta polaridad pero no volátil como es el propilenglicol, por lo cual es necesario im-

pregnar el papel con la fase fija introduciéndolo en una mezcla de propilenglicol: metanol (1:1) antes de aplicar la muestra.

La movilidad cromatográfica de los diferentes esteroides se expresa en términos de  $R_T$  que puede definirse como la distancia en centímetros recorridos en el papel por el compuesto al final del proceso, entre el número de horas en que éste se llevó a cabo.

Otra forma de expresión de la movilidad es el valor de  $R_F$  que representa los centímetros recorridos en el papel por el esteroide, entre los centímetros recorridos por la fase móvil.

Tanto los valores de  $R_F$  como de  $R_T$  son específicos y constantes para cada esteroide en un sistema determinado, por lo cual son datos que por sí solos pueden orientarnos en la identificación de la estructura química de la molécula en estudio.

El extracto metanólico libre de lípidos se cromatografió en diversos sistemas de solventes para separar y purificar cada uno de los productos formados en la incubación. Para todas las cro-

matografías se utilizó papel filtro Whatman No. 1, previamente lavado durante 48 horas con una mezcla de benceno/metanol 1:1. Al no ser posible disponer de un cuarto mantenido a temperatura constante, para poder controlar el tiempo del desarrollo de las diversas cromatografías, se utilizó como referencia a cada lado del cromatograma de papel, el colorante 1-metilamino-4-amino-antraquinona (F-11) el cual tiene la particularidad de descomponerse en 4 diferentes colores que en orden de polaridad decreciente son: Morado, azul violáceo, rosa y azul claro [39]. También se utilizaron como referencia en cada proceso de cromatografía, 100 µg de los diversos esteroides no radiactivos. La localización en el papel de los diferentes metabolitos radiactivos se efectuó por medio de un radiocromatógrafo Scanner Modelo 7201 de Packard Instrument Co.

Los esteroides no radiactivos agregados al extracto inicial y los utilizados como referencia se identificaron por medio de las siguientes reacciones de color:

- a) Reacción de Zimmarman. El reactivo descrito

por Zimmermann para identificar funciones cetónicas específicamente en el carbón 17, esta constituido por una mezcla de partes iguales de soluciones metanólicas de m-dinitro benceno e hidróxido de potasio. Este reactivo produce una coloración violeta característica [40].

- b) Reacción con Acido Fosfomolibdico. La pregnenolona fue identificada con una solución preparada con ácido fosfomolibdico en metanol, con la cual produce un color verde al ser calentada a 80 °C [41].
- c) Reacción con HAIN. La presencia de un grupo  $\Delta^4_{3=0}$ , se manifestó por el desarrollo de una coloración amarilla intensa en contacto con la hidrazida del ácido isonicotínico (HAIN) en metanol y en presencia de ácido clorhídrico concentrado [42].
- d) Reacción con Azul de Turnbull. El anillo A con estructura fenólica de los estrógenos, reacciona con el azul de Turnbull (ferricianuro férrico) produciendo una coloración azul estable en presencia de ácido clorhídrico IN [43].

e) Absorción de Luz Ultravioleta. Una función  $\Delta^4$ -3-cetona le confiere a la molécula esteroide la capacidad de absorber la luz ultravioleta de una longitud de onda de 250 nm, propiedad física que se utiliza para identificar esteroides con este tipo de estructura [44].

c) Recuperación de los Esteroides de los Cromatogramas.

Una vez localizados en las tiras cromatográficas los esteroides, tanto por reacciones de color, absorción de luz ultravioleta y detección de radiactividad, se cortaron las zonas correspondientes, las cuales se eluyeron con metanol que es un solvente capaz de disolver a todos los esteroides y con el que se obtienen recuperaciones de un 100%. Posteriormente, el metanol se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio con vacío.

De estos extractos se tomaron alícuotas apropiadas para medir radiactividad y someterlos después a una nueva cromatografía o recristalizarlos a actividad específica constante, como paso final.

D) Determinación de la Pureza Radioquímica.

La estructura química de los metabolitos radiactivos aislados y purificados por cromatografía, se estableció al agregar una cantidad extra del esteroide no marcado para poder recristalizarlo varias veces, hasta obtener una actividad específica constante, tanto en los cristales como en las aguas madres, lo cual indicó que la estructura del compuesto agregado era igual a la del compuesto radiactivo, ya que lo que en realidad estabamos realizando era una dilución de la actividad específica original.

La determinación de la A.E. se obtuvo tomando una alícuota de aproximadamente 1 mg, tanto de los cristales como de las aguas madres (previamente secadas) y pesándola exactamente en una electrobalanza Cahn, modelo G-2, calibrada a 1 mg. El contenido de la radiactividad de cada alícuota pesada se obtuvo al disolverla en 10 ml de la solución de centelleo y contarla durante un tiempo adecuado en el espectrómetro de centelleo liquido.

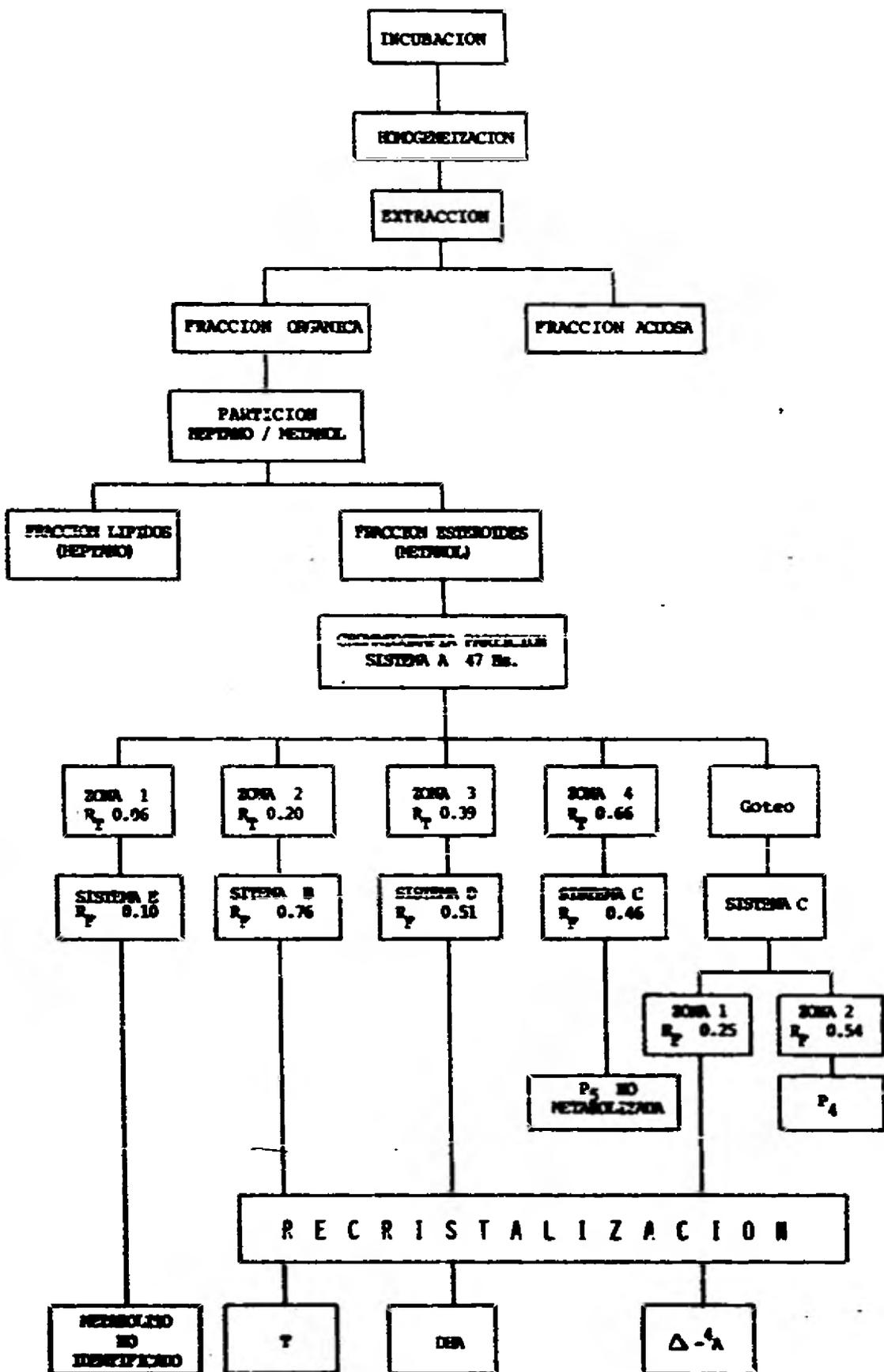


FIGURA 3

#### IV. RESULTADOS

Después de haber sometido los homogeneizados de los tejidos a un proceso repetido de extracción, se obtuvieron dos fracciones: la fracción orgánica (diclorometano) y la fracción acuosa (Figura 3).

En la fracción orgánica se encontró el 98% de la radiactividad incubada que correspondió a compuestos no esterificados (esteroides libres), en cambio, en la fracción acuosa en la que se encuentran esteroides de alta polaridad (conjugados), solo se obtuvo un 2% de la radiactividad inicial (Tabla IV).

La fracción orgánica libre de lípidos, después de la partición entre heptano y metanol acuoso, contenía un 78% del tritio. A los extractos de diclorometano de las gónadas correspondientes a los fetos de menor edad, no fué necesario someterlos a esta última partición debido a su escaso contenido de lípidos (Tabla IV).

La fracción de "esteroides libres" se cromatografió en el sistema A (Figura 3) durante 57 horas, localizándose 4 zonas radiactivas en el cromatograma. En el goteo colectado se encontró también una cantidad importante de radiactividad que corresponde a los esteroides de poca polaridad.

T A B L A IV

CONTENIDO DE RADIACTIVIDAD EN LAS DIFERENTES FRACCIONES (%)				
Experimento No.	F. Orgánica	F. Acuosa	F. Heptano	F. Metanol
1	98.1	1.3	-	-
2	97.3	1.8	13.8	81.3
3	96.7	2.3	17.4	78.6
4	97.4	2.0	12.8	83.4
5	96.6	2.1	-	-
6	96.8	1.7	19.6	73.0
7	97.0	1.7	15.4	78.9
8	94.5	1.8	19.8	71.2

Zona 1. Esta zona que fué la más polar, con un  $R_T$  de 0.06, correspondió a la zona en que fueron localizados por medio del reactivo de azul de Turnbull los acarreadores de estrona y estradiol. Después de eluirla y determinar su contenido de tritio, se recromatografió en el sistema E (Tabla I) en el cual presentó un  $R_F$  (0.10) diferente al estradiol (0.15) y estrona (0.53). No se realizaron intentos posteriores para establecer la estructura de esta zona debido a su bajo contenido de radiactividad.

Zona 2. La zona con una movilidad cromatográfica idéntica al acarreador de testosterona ( $R_T$  0.20), se identificó tanto por su absorción de luz ultravioleta como por el desarrollo de una coloración amarilla intensa con el reactivo de HAIN. Después de cuantificar la radiactividad presente, se recromatografió en el sistema B (Tabla I), en el cual volvió a coincidir exactamente con la testosterona no marcada, calculándose un  $R_F$  de 0.76 para ambos.

Con estas evidencias sobre la naturaleza de la estructura química del compuesto presente en esta zona, se tomó una alícuota, a la cual se agregó una cantidad tal de testosterona no radiactiva para obtener una proporción  $\text{dpm/mg}$  apropiada y realizar recristalizaciones sucesivas enme-

tanol, hasta obtener una actividad específica constante igual en los cristales y en las aguas madres. Los resultados de las cristalizaciones de la testosterona-<sup>3</sup>H aislada en los 8 experimentos se observan en la Tabla V.

Zona 3. Esta zona radiactiva, con un  $R_T$  de 0.39, presentó la misma movilidad que la dehidroepiandrosterona "fría" la cual, con el reactivo de Zimmermann, desarrolló la coloración violeta característica de los compuestos esteroides con un grupo cetónico en el carbón 17.

La identificación de esta zona se llevó a cabo al recromatografiarla en el sistema D (Tabla I), en donde exhibió un  $R_F$  de 0.51 idéntico al establecido en este sistema para la dehidroepiandrosterona. Por las recristalizaciones sucesivas de una alícuota con DHA no radiactiva, se estableció definitivamente la estructura química de este metabolito tritiado. Los datos de las recristalizaciones se muestran en la Tabla VI.

Zona 4. La movilidad de la radiactividad presente en esta zona, con un  $R_T$  de 0.66 y su posterior cromatografía en el sistema C (Tabla I), en donde se estableció un  $R_F$  de 0.46, indicó que el compuesto aislado corresponde a la pregnenolona-<sup>3</sup>H no metabolizada, por lo que no se consideró de interés su recristalización.

T A B L A V

PUREZA RADIOQUIMICA DE LA TESTOSTERONA- <sup>3</sup> H AISLADA DE LOS EXPERIMENTOS		
Experimento No.	Cristales dpm- <sup>3</sup> H/mg	Aguas Madres dpm- <sup>3</sup> H/mg
1	323 399 306	464 428 383
2	622 684 672	995 710 682
3	942 948 864	965 903 898
4	224 176 173	258 181 179
5	1921 1996 1982	2306 2118 2004
6	628 667 622	977 703 677
7	769 733 713	927 812 731
8	506 459 456	520 517 492

T A B L A VI

PUREZA RADIOQUIMICA DE LA DEHIDROEPIANDROSTERONA- <sup>3</sup> H AISLADA DE LOS EXPERIMENTOS		
Experimento No.	Cristales dpm- <sup>3</sup> H/mg	Aguas Madres dpm- <sup>3</sup> H/mg
1	1899 1981 1995	2355 1949 1955
2	1536 1420 1418	1570 1429 1422
3	1273 1296 1370	1412 1339 1340
4	1938 1948 1917	1812 1889 1994
5	1757 1747 1774	2340 1695 1772
6	1826 1843 1899	2034 1853 1894
7	1810 1941 1876	1872 1799 1899
8	1194 1187 1292	1328 1271 1311

Goteo. Los metabolitos tritiados poco polares formados durante la incubación y presentes en el goteo de 57 horas, se separaron por cromatografía en el sistema C (Tabla I), encontrándose dos zonas radiactivas bien definidas: la zona más polar que coincidió con el acarreador de androstendiona localizado por reacción de Zimmermann, HAIN y absorción de ultravioleta, presentó un  $R_f$  de 0.25. La recristalización de una alícuota del contenido de esta zona con androstendiona pura no radiactiva se muestra en la Tabla VII, con excepción del experimento 3 cuyo escaso contenido de radiactividad no permitió realizar el procedimiento de recristalización.

La zona menos polar, con un  $R_f$  de 0.54, se identificó como progesterona exclusivamente en base a su movilidad cromatográfica y por las reacciones de color y absorción de ultravioleta de su acarreador, ya que no fue posible recristalizarla en virtud de la poca radiactividad presente.

La conversión de la pregnenolona-<sup>3</sup>H a los metabolitos radiactivos identificados como dehidroepiandrosterona, androstendiona y testosterona se muestran en la Tabla VIII, y está expresada como picomolas/g de tejido y picomolas/gónada.

T A B L A VII

PUREZA RADIOQUIMICA DE ANDROSTENDIONA- <sup>3</sup> H AISLADA DE LOS EXPERIMENTOS		
Experimento No.	Cristales dpm- <sup>3</sup> H/mg	Aguas Madres dpm- <sup>3</sup> H/mg
1	541 690 690	775 702 682
2	- - -	- - -
3	360 301 314	385 392 334
4	1020 1056 961	1137 1146 1102
5	1307 1397 1384	1412 1400 1396
6	119 122 138	165 147 132
7	1238 1217 1272	1367 1301 1291
8	740 654 616	650 680 650

T A B L A VIII

METABOLITOS RADIOQUIMICAMENTE PUROS FORMADOS DURANTE LA INCUBACION DE GONADAS FETALES DE EQUINO CON PREGNENOLONA-<sup>3</sup>H

Experimento No.	Dehidroepiandrosterona		Androstendiona		Testosterona	
	pm/g Tejido	pm/Gónada	pm/g Tejido	pm/Gónada	pm/g Tejido	pm/Gónada
1	740.0	78.5	5.1	0.6	2.8	0.3
2	4.3	81.2	-	-	0.2	2.8
3	2.6	57.2	0.3	6.6	0.2	4.3
4	4.3	92.2	0.2	4.3	0.1	1.9
5	4800.0	480.0	185.0	18.5	600.0	60.0
6	17.5	332.3	0.4	6.5	0.7	13.0
7	17.9	404.0	1.9	42.3	0.6	12.5
8	9.2	197.4	0.8	17.9	0.8	16.1

Estos valores de conversión se obtuvieron de las recristalizaciones, multiplicando el valor promedio de la A.E. por los mg de compuesto "frío" agregados al inicio de este proceso y por la cantidad total de radiactividad presente en la zona correspondiente, en la última cromatografía.

Como puede verse en la Tabla VIII, no existen diferencias importantes en la conversión a metabolitos de 19 átomos de carbón entre el ovario y el testículo fetales cuando se expresaron los resultados en picomolas/gónada para cada concentración del substrato incubado (0.05 y 0.5  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, los valores de conversión fueron significativamente más altos en los ovarios de los fetos más jóvenes cuando se expresan como picomolas/g de tejido (Experimentos 1 y 5).

## V. DISCUSION

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron la capacidad de las gónadas fetales equinas para biotransformar in vitro pregnenolona isotópicamente marcada con tritio en dehidroepiandrosterona-<sup>3</sup>H, androstendiona-<sup>3</sup>H y testosterona-<sup>3</sup>H radioquímicamente puras. Estos hallazgos dan evidencia de la presencia de  $3\beta$ -ol deshidrogenasa,  $\Delta^4$ - $\Delta^5$ -isomerasa,  $17\alpha$ -hidroxilasa,  $17$ - $20$ -desmolasas y  $17\beta$ -oxido-reductasa tanto en el ovario como en el testículo del caballo a diferentes estadios de la gestación.

Debe señalarse que esta evidencia de la formación de andrógenos con actividad biológica, particularmente testosterona, por el ovario fetal equino, constituye la primera demostración en mamíferos de que la gónada femenina es capaz durante la vida intruterina de biosintetizar hormonas androgénicas. Las vías metabólicas utilizadas por el ovario fetal equino para formar testosterona a partir de pregnenolona, fueron tanto la ruta de los compuestos  $\Delta^4$  como de los  $\Delta^5$ .

En efecto, se lograron identificar 2 compuestos intermedios como son la dehidroepiandrosterona y la androstendiona, poniendo de manifiesto que las rutas metabólicas operantes fueron las siguientes:

a): Pregnenolona  $\longrightarrow$   $17\alpha$ -OH pregnenolona  $\longrightarrow$  dehidroepiandrosterona  $\longrightarrow$  androstendiona  $\longrightarrow$  testosterona (vía de los  $\Delta^5$ )

y .

b): Pregnenolona  $\longrightarrow$  progesterona  $\longrightarrow$   $17\alpha$ -OH progesterona  $\longrightarrow$  androstendiona  $\longrightarrow$  testosterona. (vía de los  $\Delta^4$ ) (Figura 4).

La incapacidad para identificar tanto a la  $17\alpha$ -OH pregnenolona como a la  $17\alpha$ -OH progesterona como metabolitos intermediarios, se explica por la gran eficiencia de la 17.20-desmolasa, que al romper la cadena lateral de los compuestos C-21,  $17\alpha$ -hidroxilados, los convierte en compuestos C-19 con la estructura  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -OH ó  $\Delta^4$ -3=O- correspondientes como ha sido demostrado en otros órganos productores de hormonas esteroides.

Es de gran interés por otra parte, el señalar la adecuada correlación existente entre los hallazgos ultraestructurales y funcionales de la gónada fetal equina. En efecto el ovario fetal a una edad muy temprana de la gestación (decimoprimer semana) muestra al ser estudiado con el microscopio electrónico, que posee los organelos intracelulares con el aspecto morfológico requerido para efectuar la biosíntesis de hormonas esteroides y por otra parte posee los sistemas enzimáticos requeridos para este proceso biosintético. Por otra parte, los estudios morfológico en una etapa avanzada de la gesta -

VIAS METABOLICAS DEMOSTRADAS EN LAS GONADAS FETALES EQUINAS

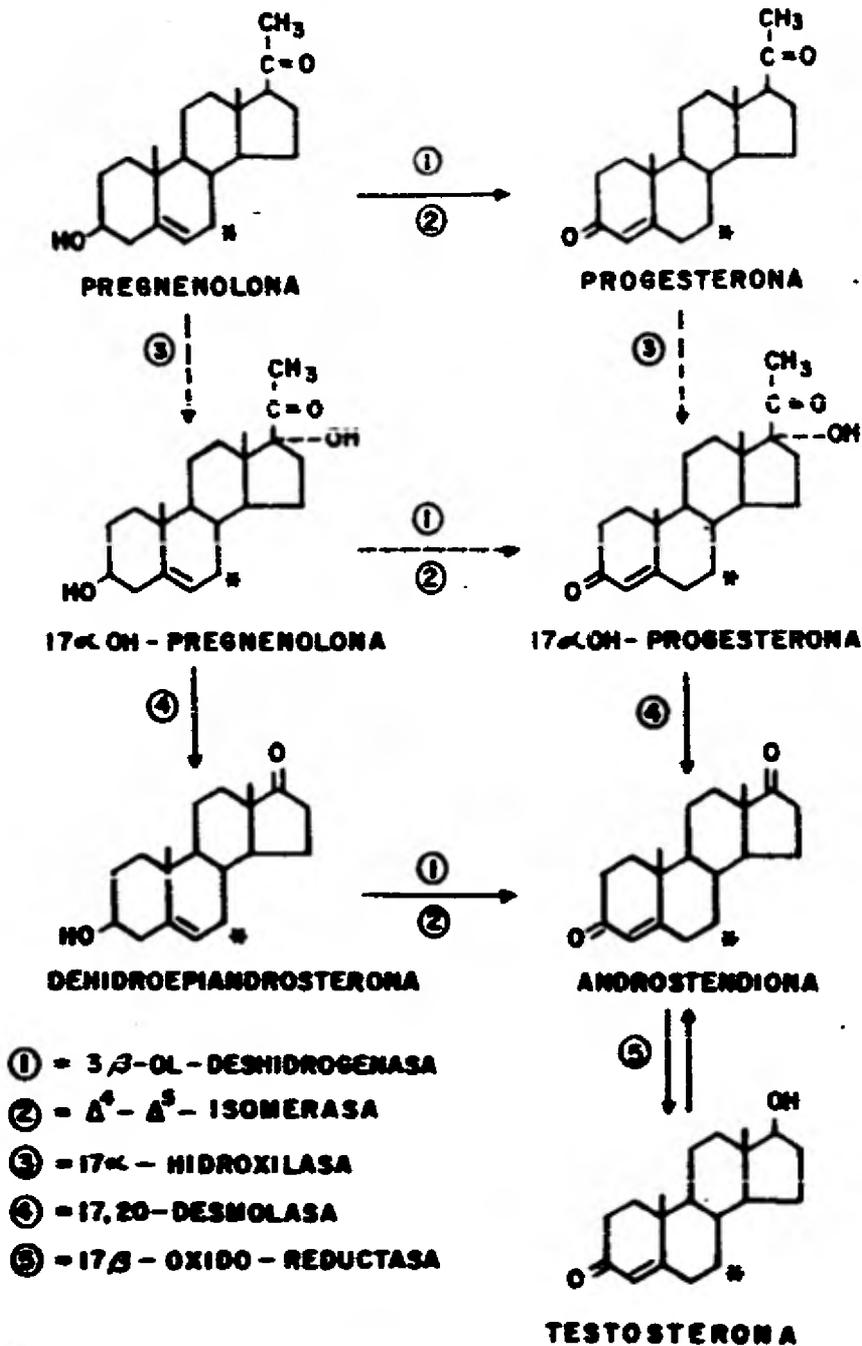


FIGURA 4

ción (trigesima semana), demuestran un incremento significativo en el incremento citoplásmico de lisosomas en la gónada femenina fetal, hallazgo que correlaciona con la demostración de una disminución en la actividad biosintética.

Por otra parte los resultados de este estudio confirman y extienden observaciones previas que demostraron que el testículo fetal equino es capaz de biosintetizar testosterona. De interés sin embargo, fué el hallazgo de que la ruta biosintética de andrógenos en el testículo fetal es similar a la encontrada en el ovario, siendo la diferencia únicamente cuantitativa.

El significado biológico de nuestros hallazgos reside en la demostración de que no solamente el testículo equino durante la vida intrauterina participa en la regulación endócrina de la gestación a través de la biosíntesis de hormonas esteroideas con actividad biológica, sino que - también la gónada fetal femenina participa en una forma activa en este proceso regulatorio. Puede por lo tanto postularse a partir de estas observaciones, que el ovario fetal al menos en esta especie, contribuye con hormonas esteroideas adecuadas a la poza hormonal de la placenta, ya que este órgano transitorio no tiene la capacidad de biosintetizar de novo hormonas esteroideas. Por

otra parte estos hallazgos permiten explicar satisfactoriamente la interrupción de la gestación en el caballo que se observa después de ooforectomía bilateral en el feto.

Finalmente, este estudio apoya el concepto sugerido en otras especies, de que el ovario fetal de los mamíferos puede jugar algún papel en la construcción del fenotipo femenino. La magnitud de tal papel deberá ser delineado en estudios subsecuentes.

### CONCLUSIONES FINALES

Las conclusiones finales obtenidas en este estudio son las siguientes:

- I. Se demostró por primera vez en el ovario fetal equino la biosíntesis in vitro de testosterona a partir de pregnenolona en diferentes estadios de la gestación, infiriendo la presencia de  $3\beta$ -ol-deshidrogenasa,  $\Delta^4$ - $\Delta^5$ -isomerasa,  $17\alpha$ -hidroxilasa,  $17,20$ -desmolasa y  $17\beta$ -óxido-reductasa.
- II. Se confirmó y se amplió la demostración de McArthur [32] de que el testículo fetal equino es capaz de biosintetizar testosterona y que la ruta biosintética es similar en ambas gónadas.
- III. Se postula en base de estas observaciones que el ovario fetal de esta especie contribuye a la regulación endócrina de la gestación y se sugiere que puede jugar algún papel en el desarrollo del fenotipo femenino.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Zuckerman, S., and Baker, T.G. The development of the ovary and the process of oogenesis. En: The ovary, Vol. I. Zuckerman, L., and Weir, B.J. Eds. Academic Press. 1977, p. 42.
2. Jost, A. The role of fetal hormones in prenatal development. The Harvey Lectures, Series 55, Academic Press, New York, N.Y. 1961 p. 201.
3. Wachtel, S.S., Basrur, P., Koo, G.C. Recessive male determining genes. Cell 15:279-281,1978.
4. Josso, N. Action du testicule humain sur le canal de Muller de foetus de rat en culture organotypique C.R. Acad. Sci. Ser. D. 271:2149-2152,1970.
5. Josso, N. In vitro synthesis of mullerian inhibiting hormone by seminiferous tubules isolated from the calf fetal testis. Endocrinology 93:829-834, 1973.
6. Picard, J.Y., and Josso, N. The antimullerian hormone: Preliminary attempts at purification. En: Genetic mechanisms of sexual development. (H.L. Vallet, and I.H. Porter, Eds.). Academic Press, New York, 1979, p. 75.
7. Blanchard, M.G., and Josso, N. Source of the antimullerian hormone synthesized by the fetal testis: Mullerian inhibiting activity of fetal bovine sertoli cells in tissue culture. Ped. Res. 8:968,1974.
8. Acevedo, H.F., Axelrod, L.R., Ishikawa, E., Takkai, F. Steroidogenesis in the human fetal testis: The conversion of pregnenolone  $7\alpha$ - $^3\text{H}$  to dehydroepiandrosterone, testosterone and 4-androstene-3,17-dione J. Clin. Endocrinol. Metab. 21:1611-1613,1961.
9. Bloch, E. Metabolism of 4- $^{14}\text{C}$ -progesterone by human fetal testis and ovaries. Endocrinology 74:833-845, 1964.
10. Serra, G.B., Pérez-Palacios, G., and Jaffe, R.B. De novo testosterone synthesis in the human fetal testis. J. Clin. Endocrinol. Metab. 30:128-130,1970.

11. Jungmann, R.A., Schweppe, J.S. Biosynthesis of sterols and steroids from acetate- $^{14}\text{C}$  by the human fetal ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 27:1599-1604,1968.
12. Roberts, J.D., and Warren, J.C. Steroid biosynthesis in the fetal ovary. *Endocrinology* 74:846-852, 1964.
13. Diczfalusy, E. Endocrinology of the foetus. *Acta Obstet. Gynec. Scand.* 41, Supl. 1, 45-58,1962.
14. Huhtaniemi, I.T., and Vihko, R. Determination of unconjugated and sulfated neutral steroids in human fetal blood of early and mid-pregnancy. *Steroids* 16: 197-206,1970.
15. Pérez-Palacios, G., Pérez, A.E., and Jaffe, R.B. Conversion of pregnenolone- $7\alpha$ - $^3\text{H}$ -sulfate to other  $\Delta^5$ - $3\beta$ -hydroxysteroid sulfates by the human fetal adrenal in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 28: 19-25,1968.
16. Lamont, K.G., Pérez-Palacios, G., Pérez, A.E., and Jaffe, R.B. Pregnenolone and pregnenolone sulfate metabolism by human fetal testis in vitro. *Steroids* 16:127-140,1970.
17. Payne, A.H., and Jaffe, R.B. Androgen formation from pregnenolone sulfate by the human fetal ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39:300-304,1974.
18. Huhtaniemi, I.T., Korenbrot, C.C., and Jaffe, R.B. hCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44:963-967,1977.
19. Huhtaniemi, I.T., Korenbrot, C.C., and Jaffe, R.B. Content of chorionic gonadotropin in human fetal tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 46:994-997,1978.
20. Milewich, L., George, F.W., and Wilson, J.D. Estrogen formation by the ovary of the rabbit embryo. *Endocrinology* 100:187-195,1977.
21. George, F.W., and Wilson, J.D. Conversion of androgen to estrogen by the human fetal ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47:550-555,1978.

22. Cole, H.H., and Hart, G.H. The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat. *Am. J. Physiol.* 93:57-68,1930.
23. Cole, H.H., Hart, G.H., Lyons, W.R., and Catchpole, H.R. The development and hormonal content of fetal horse gonads. *Anat. Rec.* 56:275-293,1933.
24. Short, R.V. Progesterone in tissues and body fluids. Ph.D. dissertation, University of Cambridge, 1958.
25. Cox, J.E. Oestrone and equilin in the plasma of the pregnant mare. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 23:463-468 1975.
26. Raeside, J.I., Liptrap, R.M., and Milne, F.J. Relationship of fetal gonads to urinary estrogen excretion by the pregnant mare. *Amer. J. Vet. Res.* 34: 843-845,1973.
27. Catchpole, H.R., and Cole, H.H. The distribution and source of oestrin in the pregnant mare. *Anat. Rec.* 56:275-293,1933.
28. Bhavnani, B.R., Short, R.V., and Solomon, S. Formation of estrogens by the pregnant mare: I. Metabolism of 7-<sup>3</sup>H-dehydroisoandrosterone and 4-<sup>14</sup>C-androstenedione injected into the umbilical vein. *Endocrinology* 85:1172-1179,1969.
29. Bhavnani, B.R., Short, R.V., and Solomon, S. Formation of estrogens by the pregnant mare. II. Metabolism of <sup>14</sup>C-acetate and <sup>3</sup>H-cholesterol injected into the fetal circulation. *Endocrinology* 89:1152-1157, 1971.
30. Bhavnani, B.R., and Short, R.V. Formation of steroids by the pregnant mare. III. Metabolism of <sup>14</sup>C-squalene and <sup>3</sup>H-dehydroepiandrosterone injected into fetal circulation. *Endocrinology* 92:657-666,1973.
31. Bhavnani, B.R., and Short, R.V. Formation of steroids by the pregnant mare. IV. Metabolism of <sup>14</sup>C-mevalonic acid and <sup>3</sup>H-dehydroisoandrosterone injected into the fetal circulation. *Endocrinology* 92: 1397-1404,1973.

32. MacArthur, E., Short, R.V., and O'Donnell, V.J. Formation of steroids by the equine foetal testis. *J. Endocr.* 38:331-336,1967.
33. Davies, J., Dempsey, E.W., and Wislocki, G.B. Histochemical observations on the fetal ovary and testis of the horse (*Equus caballus*). *J. Histochem. Cytochem.* 5:584-590,1957.
34. González-Angulo, A., Hernández-Jauregui, P., and Márquez-Monter, H. Fine structure of gonads of the fetus of the horse. *Am.J.vet.Res.* 32:1664-1676,1971.
35. Hay, M.F., and Allen, W.R. An ultrastructural and histochemical study of the interstitial cells in the gonads of the fetal horse. *J. Reprod.Fert.Suppl.* 23: 557-561,1975.
36. Merchant-Larios, H. Ultrastructural events in horse gonadal morphogenesis. *J.Reprod.Fert. Suppl.*27:479-485,1979.
37. Bush, I.E. Methods of paper chromatography of steroids applicable to the study of steroids in mammalian blood and tissues. *Biochem. J.* 50:370-382,1952
38. Savard, K. Some theoretical and some practical aspects of partition chromatography of ketosteroids. *Recent Progr. Hormone Res.* 9:185-211,1954.
39. Neher, R. Steroids chromatography. Elsevier Publishing Co. Ed. Amsterdam, 1964, p. 111.
40. Axelrod, L.R. The separation and identification of mixtures of C<sub>21</sub> and C<sub>19</sub> steroids by paper chromatography *J. Biol. Chem.* 205:173-184,1953.
41. Neher, R. Steroid chromatography. Elsevier Publishing Co. Ed. Amsterdam, 1964 p. 120.
42. Weichselbaum, T.E., and Margraf, H.W. Determination of  $\Delta^4$ -3-keto-corticosteroids in human peripheral plasma by the isonicotinic acid hydrazide (INH) reaction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 17:959-965,1959.
43. Neher, R. Steroid chromatography. Elsevier Publishing Co. Ed. Amsterdam 1964, p. 132.
44. Kline, W. The chemistry of the steroids. Methuen and Co. Ltd. Ed. Londres 1957, p. 46.