



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PAPEL DEL FACTOR SEMEJANTE A INSULINA
(IGF-I) EN LA PRODUCCION DE ESTEROIDES EN
LAS CELULAS DE LA GRANULOSA EN EL OVARIO
DEL RATON *Mus musculus musculus*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
OMAR GRANADOS PORTILLO



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

JURADO ASIGNADO

Presidente Prof. Graciela Meza Ruíz.

Vocal Prof. Rogelio Rodríguez Sotres.

Secretario Prof. Ma. Irma Villalpando Fierro.

1er. suplente Prof. Arturo Victor Rosales Olivares.

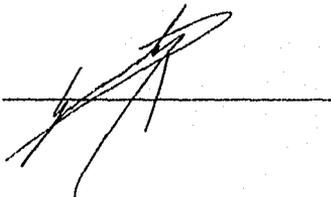
2do. suplente Prof. Elena Zambrano González.

Trabajo desarrollado en el Laboratorio de Biología del Desarrollo
del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Asesor: Dra. Ma. Irma Villalpando Fierro



Sustentante. Omar Granados Portillo



DEDICATORIAS

A mi padre: Pedro

Por tener siempre su apoyo y consejo. Por que aunque no lo crea tus llamadas de atención han servido en forjar mi caracter y poder salir adelante, pero sobre todo por el gran sacrificio y trabajo que has tenido que realizar sólo para darme una educación para que sea alguien en la vida. Mil gracias.

A mi madre: Martha

Por que representas la mayor columna que me sostiene siempre, en la enfermedad y en la salud. Por que has sabido darme lo mejor de ti. Gracias por tratar de entenderme y saber guiarme en este camino tan difícil. Por todo el amor y cariño que nos tienes.

No hay palabras para expresar la gratitud a los dos, pues gran parte de lo que soy es por ustedes. Los amo.

A mi hermana Rigel por compartir mi vida en la adversidad y en la alegría. Saber que puedo contar con alguien muy especial. Te quiero mucho.

A mis tías: María, Esperanza y Rosario por todo su cariño.

A mis tíos: Luis y Pedro.

Dedicatoria

Gracias Dios:

Por permitirme llegar hasta este punto en mi vida.
Por poder resistir la adversidad de la enfermedad.
Por iluminarme en un camino lleno de espinas.
Por regalarme dos faros inmensos: Mis padres.
Por conocer a verdaderos amigos que entienden mi ser.
Por no dejarme caer en la insensibilidad.
Por forjarme y darme fuerzas día con día, para seguir adelante
en una vida "diferente".
Pero sobre todo, por ser lo que soy y no ser otro más en este
mundo.

Infinitas gracias Señor.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Irma Villalpando Fierro por despertar en mi el interés por las intimidades de la diferenciación sexual. Por brindar desinteresadamente sus conocimientos y consejos en los momentos difíciles. Claro esta, por sus amenas pláticas y los grandes banquetes que compartimos. Gracias por ser una gran persona.

A la Facultad de Química de la UNAM.

A D.G.A.P.A. por el apoyo otorgado durante la realización de este trabajo, bajo el proyecto IN204193 que sirvió parcialmente el desarrollo del mismo.

Al Dr. Enrique Pedernera del Dpto. de Embriología de la facultad de Medicina por la ayuda en la infraestructura y sus asesorías en la técnica de radioinmunoensayo realizado en el presente.

A Elma Hernández y Ana Figeroa del Dpto. de Embriología de la facultad de Medicina por su ayuda y enseñanza de la técnica de radioinmunoensayo.

Al fotógrafo Rafael Hernández Ávila por la realización de parte de los dibujos de esta tesis.

Al jurado que preside esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio: Horacio, David, Floria, Gloria y Lilia por compartir momentos muy gratos y las grandes comilonas sociales.

A Lupita por no sólo ser una compañera del laboratorio, sino saber ser una amiga.

A Tommy, Tere, Carmen, Gustavo, David; Carlos, Adolfo, Pablo y Claudia por demostrarme su amistad sincera y por las "pequeñas" parrandas y aventuras que hemos vivido.

A Claudia Martínez, Verónica Ramos, Leda, Emmy y Roxana por ser mis amigas y compartir alegrías y penas.

A Carlo U., Gilberto, Guillermo y Gerardo Cossú por ser algo más que amigos.

A Euclides, Juan Carlos y Javier por no sólo ser algo más que amigos, sino por estar siempre junto a mi en los momentos más difíciles de mi existencia. Sin sus consejos y apoyo mi camino no estaría lleno de alegría.

A toda persona que en algún momento ha dejado una huella en mi.

ÍNDICE

	Página
I. RESUMEN	1-2
II. INTRODUCCIÓN	
1. Desarrollo y diferenciación sexual del ovario	3
1.1 El estado indiferenciado	3-4
1.2 Diferenciación sexual	5-6
1.3 Origen embrionario de las células somáticas	6
a) Hipótesis mesonéfrica	6-8
b) Teoría epitelial	8
c) Doble origen del primordio gonadal	8-10
2. Diferenciación funcional del ovario	
2.1 Meiosis	10-12
2.2 Modelos propuestos para explicar la foliculogénesis	13
2.3 Crecimiento y maduración folicular	14-15
3. Control nervioso de la diferenciación folicular	16-23
3.1 Hipófisis	16-17
3.2 Función de las gonadotropinas	17-19
3.3 Receptores a FSH	19-20
4. Esteroides foliculares	20
4.1 Fuentes de precursores de esteroides	24-25
4.2 Clasificación química	26
4.3 Clasificación biológica	26-30
5. Funciones del factor de crecimiento semejante a la insulina(IGF-I) en el ovario	31-34
5.1 Proteínas de unión del IGF-I	34-35
6. Agentes bloqueadores de la producción de estrógenos	

	Página
6.1 Inhibidor de aromatasas	35
6.2 Tamoxifen	35-36
6.3 Agentes potenciadores de la esteroidogénesis	36-37
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS	38-39
IV. OBJETIVOS	40
MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Reactivos químicos	41
1.1 Material	41
1.2 Animales	41
1.3 Estimulación hormonal	41-42
2. Aislamiento de gónadas	42
2.1 Obtención de la células de la granulosa	42-43
2.2 Viabilidad celular	44
2.3 Cultivo celular	44-48
3. Almacenamiento de las muestras	49
3.1 Viabilidad de los cultivos celulares	50
3.2 Radioinmunoensayo	50-52
VI. RESULTADOS	
1. Estandarización de la técnica	53-54
1.1 Efecto del IGF-I a corto y largo plazo	54-57
2. Efecto de los bloqueadores en la producción de estrógenos	
a) Inhibidor de aromatasas	58-59
b) Tamoxifén	60-61
3. Agentes mediadores de la producción de esteroides	62-64
VII. DISCUSIÓN	65-73
VIII. CONCLUSIONES	74
IX. BIBLIOGRAFÍA	75-85
X. APÉNDICE	86-89

ABREVIATURAS

Aromatasa	Complejo 19 monoxigenasa dependiente del citocromo P-450, 19-Hidroxilo deshidrogenasa y 10,19-Liasa
3 β -HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
C57BL/6J	Cepa de ratón llamado comúnmente B6
CGP	Células germinales primordiales
cpm	Cuentas por minuto
d.g.	Días de gestación
dpp	Días postpartum
E ₂	Estradiol
FSH	Hormona estimulante del folículo
FSH-RF	Factor de liberación de FSH
GH	Hormona de crecimiento
GDP	Guanidin difosfato
GTP	Guanidin trifosfato
Kd	Kilodalton(es)
LH	Hormona luteinizante
LH-RF	Factor de liberación de LH
HDL	Lipoproteína de alta densidad
LDL	Lipoproteína de baja densidad
IA	Inhibidor de aromatasas

IGF-I	Factor semejante a insulina tipo I ó somatomedina-C
IGFBP	Proteína de unión para factores de insulina
ml	Mililitro
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida
NAD+	Nicotinamida adenina dinucleótido forma oxidada
O ₂	Oxígeno
pg	Picogramo
µl	Microlitro
RIA	Radioinmunoensayo
rpm	Revoluciones por minuto
U.I.	Unidades internacionales

I. RESUMEN

El factor de crecimiento semejante a la insulina es un péptido que interviene en la regulación de la síntesis de esteroides en la capa de células granulosas del ovario. La mayor parte de los estudios sobre la endocrinología de este órgano han empleado como modelo biológico a otras especies como humano, bovinos, porcinos, conejos y rata. Sin embargo, hasta el presente se desconocen el o los mecanismos a través de los cuales este factor controla la síntesis de esteroides gonadales. En la presente investigación se estudió el efecto del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I en la producción de 17 β -Estradiol en las células de la granulosa del ovario del ratón *Mus musculus musculus* de 24 días postpartum. Se estimularon ratones hembra de la cepa *Mus musculus musculus* con 5 Unidades internacionales de Hormona estimulante del folículo durante tres días. Las células fueron aisladas por un método de microdissección y se cultivaron con y sin factor de crecimiento semejante a la insulina, así como con Hormona estimulante del folículo, la toxina del cólera, el ATP, y los inhibidores de aromatasas: 1, 4, 9(11)-Androstatrien- 3, 17-diona y el tamoxifén. Los controles de cada experimento se realizaron en ausencia del factor de crecimiento.

Los resultados muestran que la concentración de estradiol aumentó en general en todos los experimentos de cultivo en el grupo control. El factor insulínico tipo I sólo tuvo un efecto aparentemente inhibitorio en la síntesis de estradiol. El inhibidor de aromatasas disminuyó la producción de este estrógeno únicamente a los 4 días de cultivo, mientras que el tamoxifén aumentó la concentración de estradiol. El factor de crecimiento semejante a la insulina en presencia de Hormona foliculo estimulante incrementó la producción de 17 β -Estradiol. Así mismo, los niveles de este estrógeno aumentaron en presencia del ATP. La toxina del cólera incrementó la producción de 17 β -Estradiol en las células de la granulosa hasta los cuatro días de cultivo. Se plantea que posiblemente este factor de crecimiento incrementa la producción de 17 β -Estradiol a través de la acción de AMPc conocido como segundo mensajero.

II. INTRODUCCIÓN

1.- Desarrollo y diferenciación sexual del ovario

La diferenciación gonadal en los mamíferos ocurre en la vida embrionaria; este proceso consta de tres etapas: a) establecimiento del sexo genético, b) diferenciación gonadal y c) desarrollo del sexo fenotípico. La primera se inicia con la fertilización, en la segunda se lleva a cabo la diferenciación morfológica y funcional del ovario y del testículo, y en la última fase se determinan las características sexuales secundarias de cada individuo de acuerdo a su sexo genético. La etapa de interés en el presente estudio es la diferenciación funcional postnatal del ovario. Para entender este proceso es necesario describir las fases que se llevan a cabo durante el desarrollo morfológico, funcional y bioquímico de este órgano.

1.1 El estado indiferenciado

La diferenciación del ovario y del testículo se inicia con el establecimiento de la cresta genital, la cual por proliferación de las células epiteliales e invasión de mesénquima, vasos sanguíneos y las células germinales primordiales (CGP) originan la gónada indiferenciada. Esta etapa es común a hembras y machos; es decir es independiente del sexo genético de cada individuo. La gónada

indiferenciada es un órgano bilateral, localizado en la región ventral del mesonefros (Merchant-Larios, 1976). La etapa de gónada indiferenciada se origina con la colonización de la cresta genital por las CGP y con la proliferación de las células somáticas (precursoras de las células foliculares y de las células intersticiales o de la teca), estas últimas originan los cordones sexuales y el tejido estromático que constituyen los precursores del ovario (Merchant-Larios, 1976). En el ratón la etapa indiferenciada se presenta de los 10.5 a 11.5 días de gestación (d.g). Para entender mejor la organización morfológica del ovario, los elementos celulares que lo forman se han dividido en dos grupos: i) células somáticas (en el transcurso del trabajo se llamarán células de la teca y de la granulosa) y ii) las CGP, precursoras de los gametos, a éstas últimas se les ha adjudicado un origen extragonadal debido a que se localizan por primera vez en el endodermo del saco vitelino a los 8.5 d.g. (Chiquione, 1954) (Figura 1).

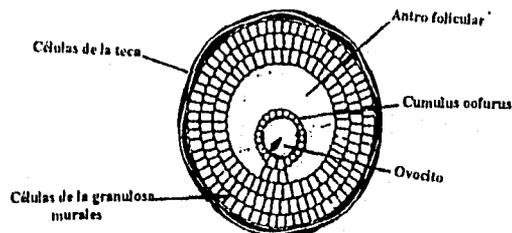


Figura 1 Esquema en que se representan las partes que conforman al ovario (modificado de células germinales y fertilización de Austin C.R r Short R.V, 1982).

1.2 Diferenciación sexual

Existen dos eventos primordiales durante la diferenciación gonadal en los mamíferos, este proceso se lleva a cabo a los 12 d.g. en el ratón:

- 1) El arreglo tisular primario; es decir la separación temprana de los cordones epiteliales del epitelio superficial ó epitelio celómico en el testículo, lo cual permite la identificación morfológica de este órgano.
- 2) La iniciación de la foliculogénesis debido a la "fragmentación" de los cordones sexuales (epiteliales) en el ovario, formados fundamentalmente por las células precursoras de la granulosa. La diferenciación de las células de la teca ó del estroma se lleva a cabo más tarde.

La diferenciación gonadal en el ovario ocurre aún en ausencia de la línea germinal (Merchant-Larios, 1984), es decir en los ovarios en los que los ovocitos han desaparecido, los cordones sexuales permanecen como tales y no se fragmentan, lo cual sugiere que las CGP juegan un papel importante en el proceso de la fragmentación de los mismos (Merchant-Larios, 1976 y Merchant-Larios y Centeno, 1981).

Por lo tanto, la foliculogénesis en el ovario parece ser seriamente afectada por la ausencia de CGP, ya que si estas faltan

aún en la presencia de los precursores de las células somáticas este proceso no se lleva a cabo. Se ha propuesto que factores inductores producidos en las células germinales podrían actuar como organizadores del proceso de foliculogénesis (Merchant-Larios, 1984.) Las CGP tienen un rol determinante en la formación de folículos primarios y aparentemente son críticas para el establecimiento del tejido esteroidogénico ovárico (Merchant-Larios y Centeno, 1981). En ratas tratadas con busulfán, droga que mata selectivamente a las CGP, el tejido esteroidogénico no se desarrolla y la producción de esteroides es baja (Merchant-Larios, 1984).

1.3 Origen embrionario de la células somáticas

El origen de las células somáticas que forman la gónada indiferenciada ha sido sujeto de controversia. Existen varias hipótesis que han tratado de explicar este proceso, pero en general se puede decir que hay dos corrientes planteadas para explicar el origen de las células somáticas que contribuyen a la formación del primordio gonadal.

a) Hipótesis mesonefrica

Byskov (1978), Upadhyay y Zamboni (1981) y Zamboni y Bézard (1979), proponen que al formarse el mesonefros ó riñón embrionario,

las células epiteliales de los tubos mesonéfricos se desdiferencian y contribuyen de esta manera a la formación del primordio gonadal.

Byskov y Lintern-Moore(1973), Byskov(1975) y Byskov y Shakkeback(1977), interpretaron la asociación continua de cordones sexuales gonadales con algunos tubulos mesonéfricos, como una estructura simple, llamada "rete ovarii", dividida en tres regiones distintas; extraovárica, conectiva e intraovárica, describiendo la formación del folículo primordial como un proceso de "migración" de las células pregranulosas de la región extraovárica a la intraovárica.

Byskov y Lintern-Moore(1973) y Byskov(1978), sugieren que las células de la granulosa parecen ser derivadas, aunque no exclusivamente de ciertas células dentro del rete ovarii, región formada de tubulos cercana al mesonefros, las cuales son muy parecidas a la de la granulosa en términos de sus organelos y microfilamentos .

Así mismo, Zamboni y Bézard(1979) y Upadhyay y Zamboni(1981) basados en evidencias obtenidas en estudios de microscopia electrónica; plantean que las células somáticas de los cordones sexuales en las gónadas de ratones y ovejas provienen de un mesonefros diferenciado. Si esto es correcto, las células de Sertoli del testículo y las células de la granulosa en el ovario

serían derivados del mesonefros. Sin embargo, hasta la fecha aún no se ha esclarecido completamente el origen embrionario de las células que forman el ovario.

b) Teoría epitelial

Gruenwald(1942), Horbes(1942) y Torrey(1945) sugieren que el ovario y el testículo derivan de células del epitelio celómico. Si la gónada indiferenciada se diferencia en ovario, los cordones sexuales involucionan y el epitelio celómico lleva a cabo una segunda proliferación, la cual forma los cordones sexuales secundarios que dan origen a los epitelios foliculares que recubren los ovocitos. Si la gónada se diferencia a testículo, los cordones pasan a ser cordones seminíferos.

c) Doble origen del primordio gonadal

Estudios realizados por Merchant (1975 y 1979) en la rata y el ratón, apoyan el doble origen de las células somáticas que forman la gónada. Este autor realizó estudios de autorradiografía con timidina tritiada y vio que al inyectar embriones de rata a los 12 d.g, este nucleótido tenía su máxima incorporación a DAN a las 24 horas de incorporada la timidina; a esta edad la gónada ya se había diferenciado en testículo. Además, encontró que las células del

epitelio interno están dispersamente marcadas, mientras que en el mesénquima y en el epitelio celómico la incorporación de timidina es muy clara. En el ovario a las 30 horas después de administrada la marca, la timidina se localizaba en la células del epitelio interno, cerca del epitelio celómico. Estas observaciones demuestran que hay diferencias en la duración del ciclo celular en los diferentes tipos celulares, de tal forma que se nota que en el epitelio celómico y el mesénquima el ciclo celular es corto, mientras que el epitelio interno tiene un ciclo celular más largo. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que tanto el epitelio celómico como el mesénquima, contribuyen a la formación del blastema gonadal.

Merchant-Larios et al., (1984), inhibieron el desarrollo del mesonefros al colocar un trozo de cascara de huevo de ave en los conductos de Müller, para determinar el papel que tenía el mesonefros en la formación del primordio gonadal en aves. Estos autores observaron que el blastema gonadal en pollo se origina de la proliferación y condensación de las células mesoteliales o epiteliales y mesenquimáticas. Por lo tanto, se considera que las células somáticas tienen un doble origen. Estos resultados aparentemente apoyan el modelo propuesto por Gruenwald(1942), Horbes(1942) y Torrey(1945), quienes postularon que el epitelio

celómico experimenta una segunda proliferación. Aunque en realidad sucede es que el epitelio interno sigue proliferando y el epitelio celómico contribuye con células a la formación de la gónada. En el caso del testículo la diferenciación temprana conlleva a que la proliferación mesotelial termine pronto; mientras que en el ovario la proliferación es continua (Merchant-Larios H, et al., 1984).

2.- Diferenciación funcional del ovario

2.1 Meiosis

La meiosis es la división celular que sufren las células sexuales (ovulos y espermatozoides). Esta consta de dos divisiones celulares, la primera de las cuales implica la disminución de cromosomas a la mitad (de diploide a haploide) y permite el cambio de información genética entre pares de cromosomas, un miembro de cada par se deriva de la madre y el otro del padre. La segunda división se parece a la mitosis (división celular de células somáticas), aunque sólo en los cromosomas haploides.

Tanto la meiosis como la mitosis pasan por 4 fases: la profase, la metafase, la anafase y la telofase. El intervalo entre los ciclos celulares sucesivos se llama interfase y es importante, ya que en este momento es cuando se duplica el DNA. La profase de la primera división meiótica es excepcional porque toma mucho

tiempo para efectuarse; es altamente especializada, y se divide en seis estadios: el leptoteno, el cigoteno, el paquiteno, el paquiteno tardío, el diploteno y la diacinesis (Figura 2).

El crecimiento de la gónada femenina es muy lento comparada con el del testículo. A pesar, de que el ovario es muy parecido morfológicamente a la gónada indiferenciada, este inicia la meiosis, lo cual permite identificarlo y diferenciarlo del testículo. Las CGP en el ratón entran en la profase de la primera división meiótica a los 17 d.g.

En la mayoría de las especies de mamíferos, la profase meiótica se completa en las hembras hasta llegar al diploteno. Después del nacimiento los ovocitos entran en una "fase de descanso" ó diacinesis, que termina hasta antes de la ovulación con los cambios meióticos ovulatorios en el folículo de Graaf (Austin C. R y Short R. V., 1982b). Se ha propuesto que el factor inductor de la meiosis tiene mucha influencia sobre el número de células germinales disponibles para la reproducción, pues las ovogonias pasan a ovocitos en el momento que entran a la profase de la primera de las divisiones meióticas, y posteriormente son incapaces de proliferar. El número de células germinales disminuye durante toda la vida reproductora de las hembras a través de los procesos de atresia y de ovulación (Austin C. R y Short R. V., 1982b).

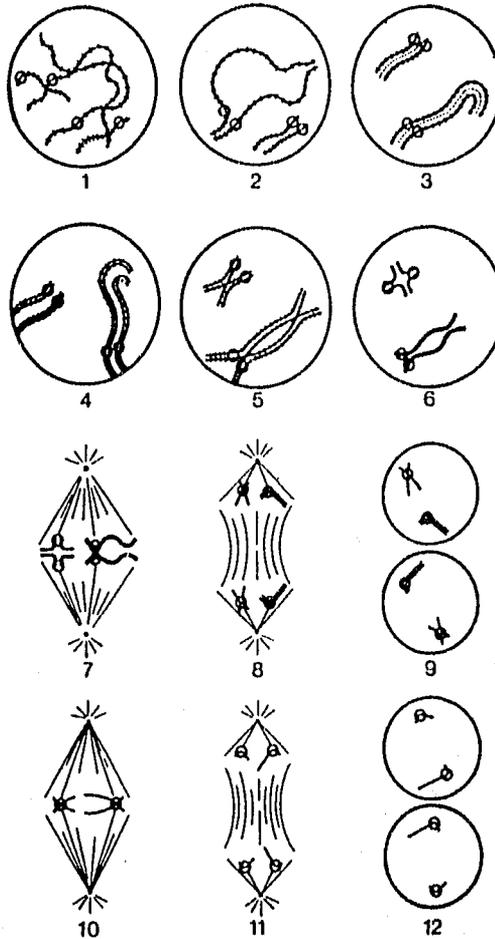


Figura 2 Diagrama que demuestra el funcionamiento de los cromosomas durante la meiosis. Para simplificar sólo se muestran dos pares de cromosomas y se presentan sólo los núcleos sin citoplasma. 1. Leptoteno; 2. cigoteno; 3. paquíteno; 4. paquíteno tardío que muestra las tétradas (dos pares de bivalentes); 5. diploteno; 6. diacinesis; 7. metafase I; 8. anafase tardía I; 9. telofase I (idealizada); 10. metafase II; 11. anafase II y 12. telofase II (óvulo y cuerpo polar) (Tomado de células germinales y fertilización de Austin C. R. y Short R. V, 1982).

2.2. Modelos propuestos para explicar la foliculogénesis

La formación de los folículos primordiales en los ovarios de mamíferos es conocido como el proceso de "foliculogénesis". Peters, en 1978 estableció tres estadios de desarrollo:

i) Un "Sincicio de células ovocíticas", en el cual los ovocitos se encuentran interconectados y rodeados por una capa delgada de células del estroma, ii) Un estadio de "ovocitos desnudos", en la cual éstos están encerrados en grupo sin intervención de otras células, y iii) el estadio de "folículos independientes", en donde los ovocitos comienzan a rodearse por células de la granulosa y una membrana basal.

Merchant-Larios y Chimal-Monroy (1989), proponen que la foliculogénesis en el ratón, se divide en tres etapas de desarrollo:

I. Estadio de ovocito. Estos se encuentran agrupados dentro de los cordones sexuales, en contacto directo, rodeados por una capa de células epiteliales separadas del estroma por una lámina basal.

II. Fase de célula epitelial. Los ovocitos son rodeados por células epiteliales en el interior de los cordones sexuales.

III. Estadio de célula estromal. Los ovocitos junto con su envoltura de células epiteliales y recubiertas por una lámina basal son individualizados por la intervención de tejido estromático.

2.3 Crecimiento y maduración folicular

Durante la foliculogénesis, un folículo primordial aumenta de 400 a 600 veces su tamaño. Cada ciclo estral crecen de 500 a 1000 folículos primordiales, pero de estos sólo unos cuantos ovulan.

Goodman y Hodgen(1983), plantean los siguientes términos para describir la foliculogénesis:

1.- Reclutamiento. Un proceso dependiente de gonadotropinas durante el cual un grupo de folículos adquiere la habilidad para responder a gonadotropinas y requiere de éstas para continuar creciendo.

2.-Selección. Pocos folículos reclutados son seleccionados, éstos no sufren el proceso de atresia(muerte folicular programada) y sobreviven para ovular.

3.- Dominancia. El mecanismo a través del cual un folículo escapa a la atresia. Se ha sugerido que algunos folículos promueven el crecimiento de otros, sin embargo, esto no se ha demostrado.

La función de cada folículo es proveer el sistema de soporte necesario para el crecimiento del ovocito. Las células de la granulosa, aportan los requerimientos nutritivos y los estímulos para el crecimiento del mismo. Se ha propuesto que estas células

controlan la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos contenidos en los folículos seleccionados para la ovulación (Gore-Langton E. R y Armstrong T. D., 1988).

Una vez formados los folículos, las células de la granulosa proliferan y los encierran para formar la capa membranosa más externa ó mural; la capa más adyacente al ovocito llamada "cumulus ooforus", establece un contacto íntimo con éste hasta el estadio preovulatorio por medio de proyecciones celulares que atraviesan la zona pelúcida (Byskov A. G., 1978).

Las células murales son adyacentes a la membrana folicular y son las primeras en diferenciarse esteroidogénicamente respondiendo a LH (Midgley A. R., 1972; Amsterdam A et al., 1975). Así mismo, en éstas células se activa la expresión de los genes de la 3β -HSD (Zoller, L. C. y Weisz J., 1979) y se hace presente la aromatasa citocromo P-450 (Zoller L. C y Weisz J., 1978). La cual forma parte de un grupo de oxidasas, localizadas en la fracción microsomal de diferentes órganos como el hígado y adrenales, así como en la porción periférica de las células de la granulosa. Este grupo de enzimas tienen como función hidroxilar y en particular el citocromo P-450 convertir los esteroides androgénicos a estrógenos por una reacción de aromatización (Zoller L. C y Weisz J., 1978 y 1979).

3. Control nervioso de la diferenciación folicular

3.1 Hipófisis

La hipófisis esta formada por la neurohipófisis ó hipófisis posterior y la hipófisis anterior o adenohipófisis. Esta última se origina embriológicamente de las bolsas de Rathke, como una evaginación del techo de la faringe. Esta porción de la hipófisis es conectada al hipotálamo a través del sistema de vasos sanguíneos portahipofisarios, a través del cual son transportados los factores de liberación(FSH-RF y LH-RF) secretados por las neuronas hipotalámicas y que establece un enlace vascular directo entre el hipotálamo y la hipófisis anterior(Ganong F. W., 1988).

El lóbulo anterior de la hipófisis es inervado por fibras nerviosas simpáticas. Sin embargo, éstas no penetran hasta los elementos secretores, por lo que la secreción de los factores de liberación es regulada por controles nerviosos de forma indirecta (Austin C. R y Short S. V., 1982a; Ganong F. W., 1988)

La hipófisis anterior secreta dos de las más importantes hormonas glicoproteicas que ejercen acciones modulatorias directamente en la gónadas, por lo que son conocidas como hormonas gonadotrópicas, éstas son la hormona folículo estimulante y la hormona luteinizante(FSH y LH) (Austin, C. R. y Short, S. V.,

1982a). Ambas hormonas están constituidas por dos subunidades, una alfa y una beta. La subunidad alfa es semejante en ambas hormonas, mientras que la subunidad beta es diferente, por lo que confiere la especificidad hormonal (Ganong F. W., 1988).

3.2 Función de la gonadotropinas

Se ha observado en ratas intactas e hipofisectomizadas, un aumento en los receptores a LH en las células murales de la granulosa si se administra estradiol seguido por FSH, lo cual indica que éstas células contienen más receptores de LH que las del "cumulus ooforus" (Zelesnick A. J et al., 1974; Amsterdam A., 1975) (Figura 3).

Channing C. P y Seymour J. E (1970); Lidner H. R et al., (1974); Nilsson L et al., (1974) y Selstam G et al., (1976) mostraron que la FSH estimulaba la producción de AMPc en el ovario. La identificación de 4 proteínas específicas de unión para AMPc en el citosol del cuerpo luteo de ovejas (Fletcher P. W., et al, 1976) y en otras células (Chambers D. A y Studds J. D., 1976), sugieren que la FSH induce un incremento en éstas.

Lostron A. J y Johnson R. E., (1966); y Eshkol A y Lunenfeld B., (1972), indicaron que la LH juega un papel importante en la diferenciación folicular temprana, probablemente por la acción de

las células de la teca. Se sabe que la LH estimula la ovulación y la luteinización de los folículos antrales presentes en el proestro y se sabe poco acerca del efecto de la LH en los folículos en crecimiento.

Cuando la LH es secretada se une sinérgicamente con la FSH para promover el crecimiento folicular. Esto se ha observado al inyectar ratas hipofisectomizadas con FSH, lo cual provoca la inducción sostenida de una gran cantidad de receptores a LH y esta relacionado con la aparición de folículos antrales (Ireland J. J y Richards J. S., 1978).

En la luteinización de los folículos antrales, existe una pérdida de receptores a LH y a FSH. Se ha sugerido que esto ocurre por otros mecanismos diferentes a la ocupación de los receptores de unión (Richards J. S et al., 1976; Rao M. C et al., 1977).

Se ha propuesto que la LH, tiene acción en algunos folículos antrales causando una pérdida de receptores a hormonas gonadotrópicas (LH y/o FSH), disminuyendo la respuesta de éstos a la estimulación hormonal y probablemente al inicio de la atresia.

Se conoce que la testosterona es producida en las células de la teca en respuesta a LH (Fortune J. E y Armstrong D. T., 1977). También que hay receptores a ésta hormona en las células de la granulosa (Schreiber J. R et al, 1976) (Figura 3). La FSH induce que

la testosterona sea transformada a estradiol por la aromatasa P-450 (Moon Y. S et al., 1975; Armstrong D. T y Papkoff H., 1976b); Erickson G. F y Ryan K. J., 1976; Makris A y Ryan K. J., 1977) (Figura 3.1).

3.3 Receptores a FSH

En la mayoría de las especies de vertebrados las células involucradas en la esteroidogénesis gonadal son de dos tipos básicos: (a) células con respuesta a LH, como las de la teca interna de la envoltura folicular y la células intersticiales del estroma, y (b) células con respuesta a FSH, como las células de la granulosa, las cuales más tarde en la maduración folicular también adquieren la habilidad de responder LH.

Las células de la granulosa de folículos preantrales poseen receptores a FSH, hasta que forman un antro folicular (cavidad presente en el ovario en el que se encuentran factores de crecimiento, proteasas y otros requerimientos para el desarrollo de éste). En la etapa de folículos preantrales las células de la teca contienen receptores a LH pero no a FSH (Richards J. S., 1980). Se ha visto que la FSH induce la síntesis de sus propios receptores, así como de los receptores a LH. Así mismo, se ha planteado que la FSH es requerida para el mantenimiento de los receptores a LH y FSH

durante toda la foliculogénesis(Hillier S. G et al., 1978 y Richards J. S., 1980)(figura 3.1).

4. Esteroides foliculares

El folículo produce esteroides sexuales, los cuales son transportados por la circulación para actuar en los órganos "blanco" y que comprenden además del sistema reproductivo, otros tejidos blanco, como el sistema nervioso central, el inmune, el hígado, el tejido adiposo y el cutáneo(Gore-Langton E. R y Armstrong D. T., 1988).

Varias evidencias sugieren la compartimentalización de la actividad esteroidogénica en el ovario(Fortune J. E y Armstrong D. T., 1977). El tejido intersticial es fundamentalmente androgénico y la células de la granulosa sintetizan principalmente estrógenos, éstas células después de la ovulación, se transforman en células luteinizantes que forman los cuerpos lúteos y secretan progesterona(Figura 3.2).

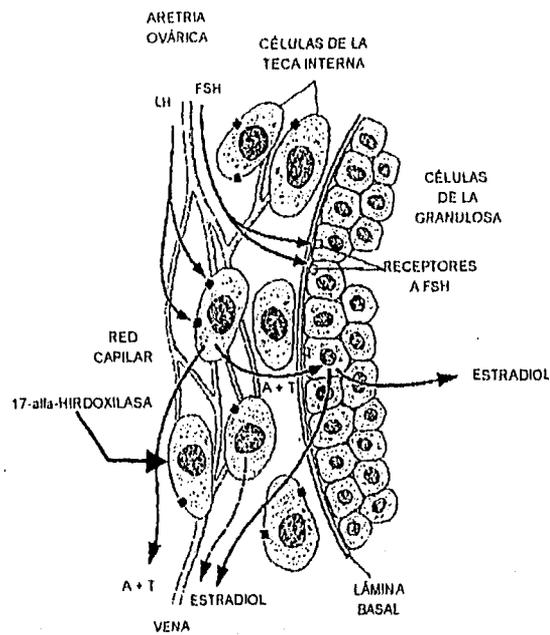


Figura 3. Esquema que muestra la acción de las hormonas gonadotrópicas (FSH y LH) en las células ováricas y la síntesis de estrógenos. Donde A= androstendiona y T= testosterona.

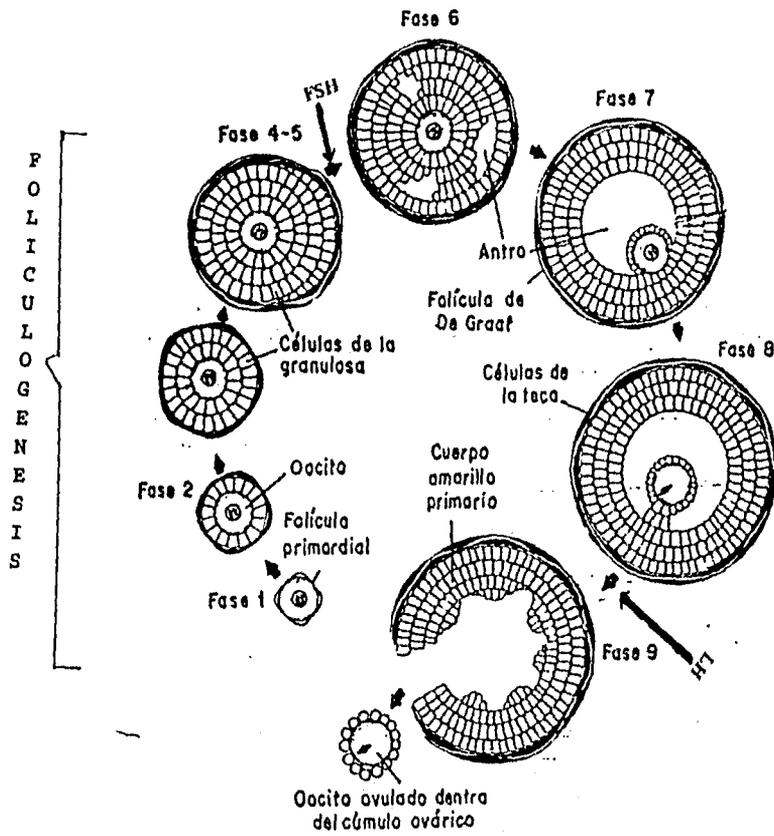


Figura 3.1 Representación diagramática del crecimiento del folículo (Modificado de células germinales y fertilización de Austin C. R. y Short R. V)..

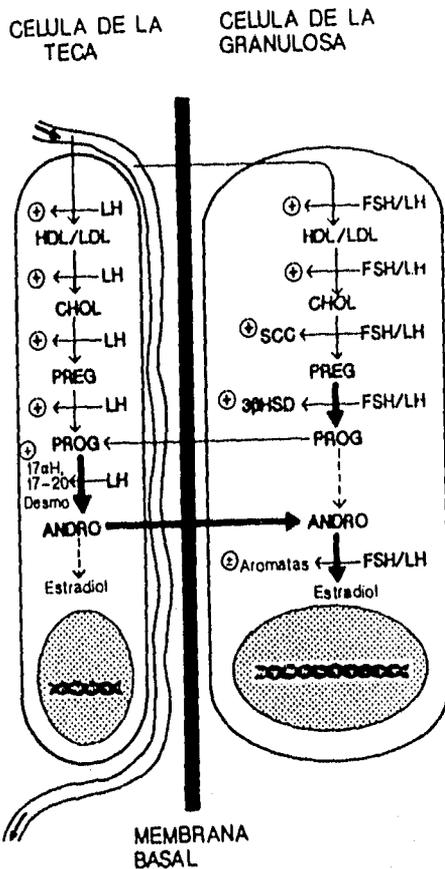


Figura 3.2 Rutas estereogénicas propuestas y enzimas para la célula de la teca y de la granulosa. La flecha oscura entre los esteroides representa la síntesis primaria del esteroide. Las flechas punteadas indican si la actividad enzimática es estimulada(+) ó inhibida(-) por FSH ó LH. Flechas de una célula a otra indica la difusión de esteroide entre ellas ó transporte a través de sistema capilar circundante al folículo. La flecha de la arteriola indican que la teca es la entrada de la sangre a las células de la teca interna. HDL/LDL= lipoprotinas de alta y baja densidad. CHOL= colesterol, PREG= pregnenolona, PROG= progesterona, ANDRO= andrógenos, SCC= enzima de división de la cadena lateral mitocondrial, 3 β-HSD= 3 β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, 17 α-H, 17-20 DESMO= 17 α-hidroxilasa y 17 desmolasa(modificada de Erickson et al; 1985, Haueh et al; 1984, Leung y Armstrong, 1980; Ireland JJ; 1987).

4.1 Fuentes de precursores esteroidales

Los esteroides foliculares son producidos por derivados del colesterol en alguna de las siguientes tres rutas metabólicas:

- a) Colesterol unido a lipoproteínas circulantes es tomado de la sangre, LDL en el hombre y otros vertebrados (Rajendran K. C et al, 1983) y HDL en el ratón (Gwynne J. T y Strauss III., 1982). Se ha demostrado que ésta es la fuente más importante de colesterol.
- b) Colesterol preformado y almacenado dentro de la célula de la teca del ovario, como colesterol libre, un constituyente de la membrana celular ó liberado del citoplasma celular de gotas lipídicas que contienen ésteres de colesterol. Estas células almacenan cantidades importantes de colesterol en gotas lipídicas intracelulares en forma de ésteres de colesterol y ácidos grasos de cadena larga y como colesterol libre. El balance entre ambos es mantenido por: la colesterol aciltransferasa y la colesterol esterasa; la acción de la primera favorece al almacenamiento de colesterol en forma esterificada y la segunda permite su movilización posterior (Strauss III J. F et al., 1981).
- c) Colesterol sintetizado *de novo*, a partir de acetato, derivado del metabolismo de carbohidratos, grasas ó proteínas dentro de la célula (Strauss III et al., 1981). En estadios foliculares antrales y preovulatorios, el colesterol intracelular es probablemente

derivado de la síntesis *de novo* y una pequeña parte del almacenado en lípidos endógenos (Chang S. C et al., 1976 y Simpson E. R et al., 1980).

La teca interna del folículo, esta irrigada de tal forma que podría utilizar el colesterol de las lipoproteínas. Mientras que, las células de la granulosa del folículo están aisladas del contacto directo con la sangre por una membrana basal impermeable, que constituye una barrera al paso de muchas moléculas incluyendo a las LDL (Shalgi R et al., 1973 y Simpson E. R et al., 1980) (Figura 3.2).

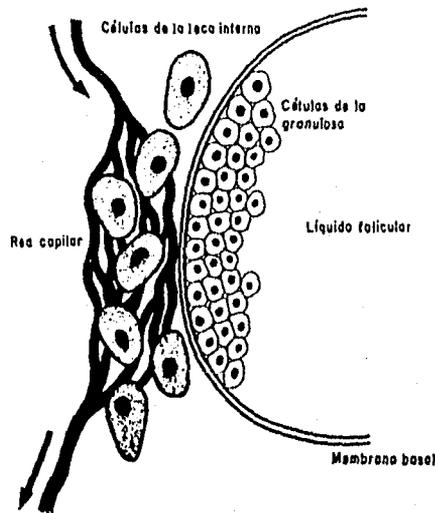


Figura 3.2 Estructura de la pared del folículo, mostrando la manera en que las células de la granulosa son privadas del aporte sanguíneo por la membrana basal (Tomado de hormonas en la reproducción de Austin C. R. y Short R. V, 1982).

4.2 Clasificación química

Hay tres clases de esteroides que se producen en los ovarios: a) Progestanos, b) Androstanos y c) Estranos. La primera clase esta representada por las progestinas que están formadas por 21 carbonos, la segunda por los andrógenos con 19 átomos de este elemento y la tercera categoria por los estrógenos con 18 átomos de carbono. Todos ellos comprenden en su estructura un esqueleto complejo, compuesto de tres anillos de ciclohexano(A,B,C) y un anillo de ciclopentano(D). El cual es conocido como núcleo ciclopentano perhidrofenantreno(Kellie A. E., 1984) (Figura 4).

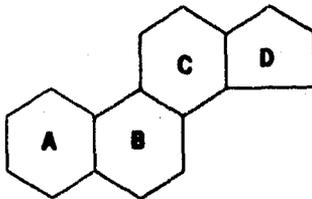


Figura 4 Estructura del esqueleto ciclopentano perhidrofenantreno.

4.3 Clasificación biológica

Los esteroides del ovario también son clasificados en base a su acción biológica:

a) Estrógenos

Estos son el 17- β -estradiol, la estrona y el estriol (Figura 4.1), este último se produce exclusivamente durante el embarazo (Doisy E. A., et al, 1929; MacCorquodale D. W., et al, 1936 y Short R. V., 1961). Hay evidencias que indican que las células de la granulosa de folículos antrales grandes y preovulatorios son los únicos sitios de la actividad de la aromatasa en el ovario y de la biosíntesis de estrógenos. FSH regula la aromatización en todas las especies estudiadas (Dorrington J. H., et al, 1975). Estudios realizados con células de la granulosa en rata sugieren que la aromatasa dependiente de citocromo P-450, es inducida por FSH y por dibutiril AMPc (Mendelson C. R., et al, 1985). La biosíntesis de estrógenos requiere la cooperación de las células de la teca que suministran los andrógenos para la aromatización (figura 4.2).

La aromatasa citocromo P-450 cataliza la aromatización de los andrógenos para formar estrógenos. La androstendiona y la testosterona, sirven como sustratos androgénicos (Kellis J. T y Vickery L. E., 1987). Esta se lleva a cabo a través de tres etapas de reacción secuenciales de hidroxilación dependientes de NADH y O₂ (Akhtar M y Skinner S. J. M., 1968, y Thompson E. A y Siiteri P. K., 1974) (Figura 4.2).

b) Andrógenos

Los andrógenos producidos en las células de la teca, son la androstendiona y la testosterona (Figura 4.1), éstos pueden ser convertidos en 17- β -estradiol y estrona.

Las células de la teca y las células intersticiales están involucradas en la producción de novo de andrógenos. Mientras que en la células de la granulosa se encuentran organizadas las rutas biosintéticas del metabolismo de conversión de esteroides de 19-carbonos a estrógenos y las de síntesis de novo de progesterona y sus derivados de 21- carbonos, después de la ovulación (Figura 4.2).

c) Progestinas

En este grupo la pregnenolona (Figura 4.1), es la más importante y es producida en el ovario, ésta es la precursora de todos los esteroides sexuales. Sin embargo, el producto más abundante de 21-carbonos en el folículo es la progesterona (figura 4.1). Este esteroide es sintetizado como intermediario en todos los estadios de crecimiento en el desarrollo folicular y como un producto final en los periodos pre y postovulatorio (Zmigrod A et al., 1972 y Armstrong D. T., 1979). La producción de progesterona y sus metabolitos, en las células de la granulosa en los folículos

antrales y preovulatorios, ocurre inicialmente en respuesta a FSH(Dorrington J. H et al., 1975) (Figura 4.2). Se ha visto que el paso limitante para que ocurra la reacción de la biosíntesis de la progesterona, ya que es regulado por la acción de la FSH, es la división de la cadena del colesterol por la 20, 22- desmolasa (Jones P. B y Hsueh A. J., 1982 y Toaff M. E et al., 1983).

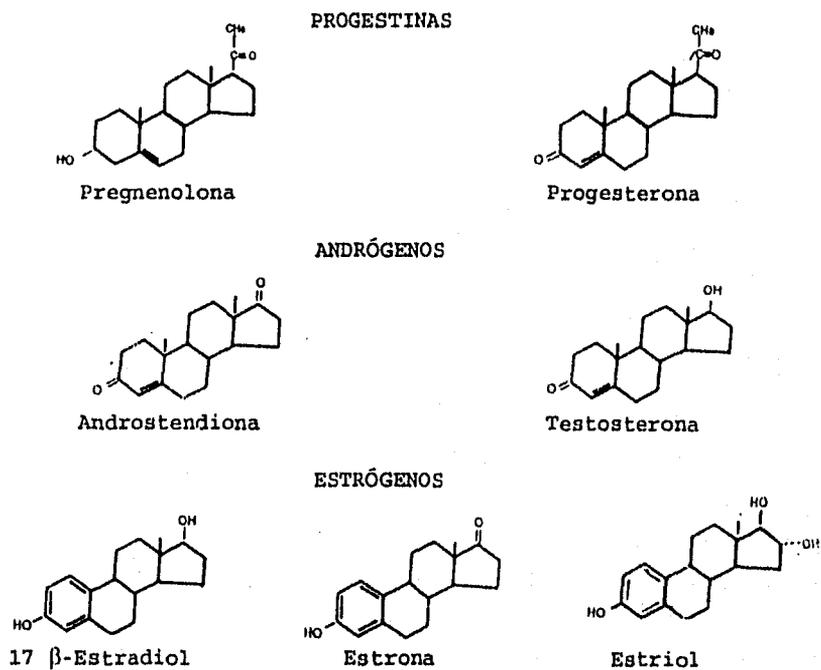


Figura 4.1 Estructuras químicas de los esteroides ováricos.

CELULA DE LA TECA O CELULA INTERSTICIAL

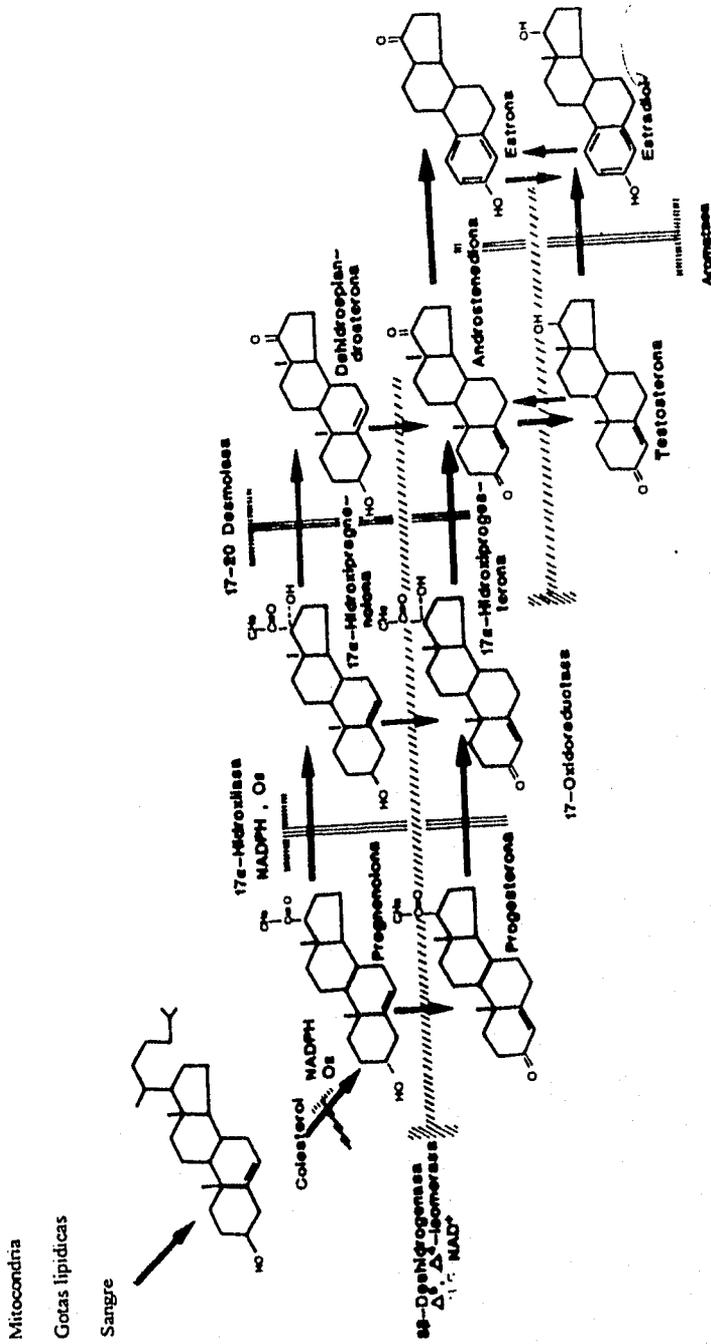


Figura 4.2 Esquema en donde se representan las rutas metabólicas de esteroides compartimentalizadas en las células del ovario. Las barras discontinuas señalan la enzima que actúa en ese paso metabólico.

5. Función del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-I) en el ovario.

Hay factores de crecimiento, que tienen efectos modulatorios *in vitro* e *in vivo* en la diferenciación funcional de las células de la granulosa, incluyendo efectos esteroideogénicos en varias especies de vertebrados. Uno de estos factores es el Factor semejante a insulina tipo I ó IGF-I (Figura 5). Sin embargo, hasta la fecha se desconocen las concentraciones reales de éste dentro de los folículos en los diferentes estadios de desarrollo, el curso celular que sigue dentro del ovario o en tejidos extraováricos y como se regulan estos procesos.

Existen dos formas de IGFs, el IGF-I que es importante para el crecimiento postnatal, y el IGF-II ó IGF con actividad estimuladora de multiplicación (MSA) esta involucrado en el crecimiento fetal (Sussenbach J. S y Steenbergh P. H., 1991). EL IGF-I es sintetizado en diversos tejidos, como útero, riñón y sistema nervioso, aunque se produce en mayor cantidad en el hígado (Murphy L. J et al., 1987 y Daughaday W. H y Rotwein P. S., 1989).

Algunas hormonas glicoproteicas como la FSH, LH y GH, parecen ser fundamentales para la amplificación de los efectos del IGF-I (Figura 5). Se ha comprobado que el mayor estimulador para la

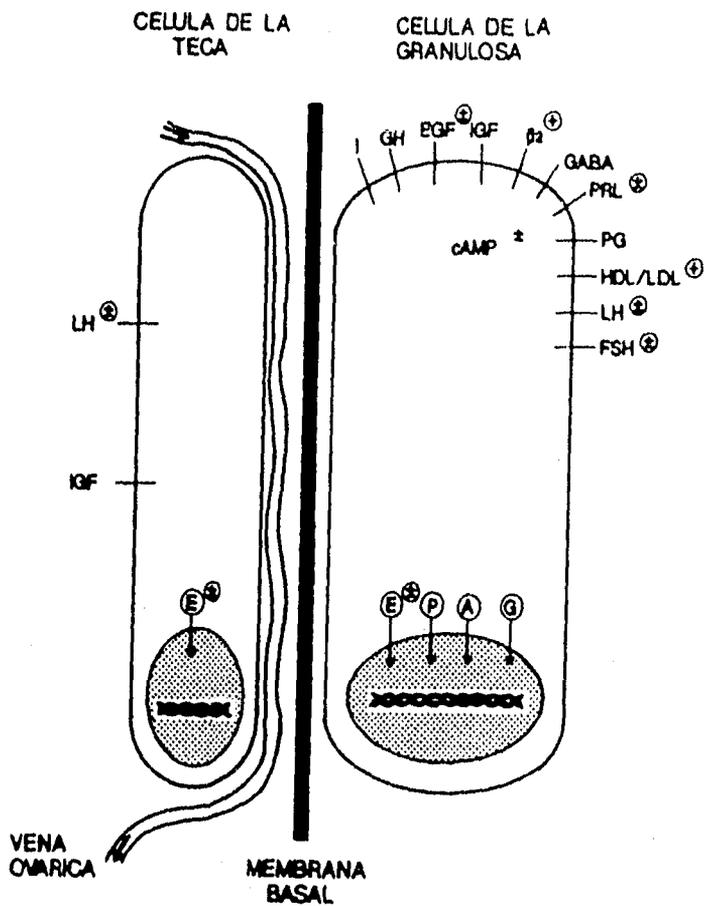


Figura 5 Sitios receptores presentes en las células de la granulosa y teca. I= insulina, GH= hormona del crecimiento, EGF= factor de crecimiento epidérmico, IGF= factor de crecimiento semejante a insulina, B₂= hormona B₂-adrenérgica, GABA= ácido gamma aminobutírico, PRL= prolactina, PG= prostaglandina, HDL/LDL= lipoproteínas de alta y baja densidad, LH= hormona luteinizante, FSH= hormona estimulante del folículo, cAMP= adenosin monofosfato cíclico, P= progesterona, A= Androstendiona, G= glucocorticoides. +- indica que las gonadotropinas pueden ser reguladas elevando o abatiendo el sitio receptor (Modificado de Haueh et al; 1984, Ireland JJ; 1987).

producción de IGF-I en el hígado es la hormona de crecimiento (Murphy L. J et al., 1987; Isgaard J et al., 1989), aunque la FSH y la LH también desempeñan una función importante en la esteroidogénesis. Se ha demostrado que IGF-I posee varias funciones modulatorias. Se ha visto que en presencia de FSH, uno de los efectos del IGF-I sobre las células de la granulosa de rata cultivadas en ausencia de suero, es aumentar la producción de progesterona y 20 α - dihidroxiprogesterona en 10 veces y 4 veces respectivamente (Adashi E. Y et al., 1984 y 1985a) y potenciar la actividad de la aromatasas (Adashi E. Y et al., 1985b). Se ha observado que el IGF-I hace más potente la acción estimuladora del AMPc sobre la biosíntesis de progesterona (Adashi E. Y et al., 1986b).

Empleando células de la granulosa de cerdo se ha demostrado que el IGF-I es un potente mitógeno y que además, interactúa con la FSH de manera sinérgica incrementando la producción de andrógenos y estrógenos (Baranao J. L. S y Hammond J. M., 1984; Wood AM et al; 1994). En ausencia de FSH el IGF-I tiene un efecto estimulador sobre la secreción de progesterona en células de la granulosa de cerdo y conejo (Veldhuis J. D et al., 1985; Cassandra X et al., 1991).

Se ha visto que el IGF-I induce la síntesis de receptores a LH en las células de la granulosa (Davoren J. B et al., 1986). En la rata, la acción del IGF-I incrementa la actividad de la aromatasas, lo que provoca un aumento en la síntesis de pregnenolona y la actividad de la 3- β -HSD con el consecuente aumento en la acumulación de progestinas (Davoren J. B y Hsueh A. J. W., 1984; Davoren J. B et al., 1985).

La acción de la FSH produce un aumento en la capacidad de unión del IGF-I en las células de la granulosa de rata (Adashi E. Y et al., 1989). Este efecto parece estar mediado por AMPc (Adashi E. Y et al., 1986a). Algunos estudios muestran que el IGF-I al unirse a sus receptores se generan una serie de agonistas que inhiben la actividad de la fosfodiesterasa ó la administración de análogos de AMPc no degradables y los niveles de este nucleótido se elevan intracelularmente (Adashi E. Y et al., 1988), lo que sugiere que los receptores para IGF-I son dependientes de AMPc.

5.1 Proteínas de unión del IGF-I.

Se han aislado y caracterizado cuatro proteínas específicas de unión para IGFs (IGFBP) (Brewer M. F et al., 1988; Wood W. I et al., 1988 y Shamasaki S et al., 1990) presentes en el suero humano, las

cuales son conocidas como IGFBP-1,2,3 y 4. La secreción de IGFBP-3 es estimulada por el IGF-I (Clemmons D. R et al., 1989), mientras que la regulación de las concentraciones en el plasma de IGFBP-1 e IGFBP-2 es más compleja. Estas dos proteínas difieren en el dominio responsable de la adherencia celular y relacionada con la capacidad de la IGFBP-1, al potenciar el crecimiento celular en respuesta a la IGF-I.

6. Agentes bloqueadores de la producción de estrógenos

6.1 Inhibidor de aromatasas

Schwarzel et al (1973), describieron una serie de inhibidores de la aromatasas siendo uno de los más activos el 1,4,6-androstatrien-3,17-diona (ATD) (Figura 6). Este compuesto se parece estructuralmente a la androstendiona. Sin embargo, el mecanismo de acción en la inactivación de la aromatasas no se conoce (Brodie HMA, 1982).

6.2 Tamoxifén

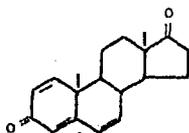
Las hormonas que estimulan el crecimiento celular en el cáncer de mama son estrógenos, producidos por la aromatización de sus precursores androgénicos por la aromatasas P-450 en la etapa postmenopausica de la mujer.

Por lo tanto, la inhibición de ésta enzima produce una regresión efectiva en el desarrollo de este tipo de cáncer. Uno de los inhibidores usados es el [Z]-1-[p-Dimetilaminoetoxifenil]-1,2-difenil-1-buteno, conocido como tamoxifen (Figura 6), un agente de terapia endócrina no esterooidal que inhibe a la aromatasas y ejerce una acción antitumoral (Manni A; 1993, Rubens R. D; 1993 y Brodie A. M: 1994).

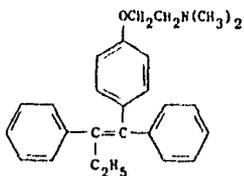
6.3 Agentes potenciadores de la esteroidogénesis

La toxina del cólera es una proteína de 87 Kd, consta de una subunidad A y cinco subunidades B. La primera consta a su vez de un péptido A₁ unido por un puente disulfuro a un péptido A₂. El péptido A₁ entra a la célula a través de un mecanismo que involucra la interacción del gangliósido G_{M1} situado en la superficie y las cadenas B de la toxina. Una vez adentro la subunidad A₁ de 23 Kd modifica covalentemente a la proteína G_s, catalizando la transferencia de ADP-ribosa del NAD⁺ a la cadena lateral de una arginina específica de la subunidad alfa de G_s, lo que bloquea su capacidad de hidrolizar a GDP el GTP unido. Es decir la proteína G queda fija en su forma activa y así, estimula continuamente a la

adenilato ciclasa, aún en ausencia de las hormonas FSH y LH, provocando un aumento en la concentración de AMPc (Stryer L; 1988).



1, 4, 6-Androstatrien-3, 17-diona (ATD)



Tamoxifén

Figura 6 Estructuras químicas de los agentes bloqueadores de la producción de estrógenos.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

A través de una serie de investigaciones, se ha observado que el IGF-I juega un papel muy importante en la fisiología del ovario. Este factor actúa aparentemente en forma sinérgica con la FSH y LH, para incrementar la producción de estrógenos, progesterona y andrógenos en las células de la granulosa y de la teca respectivamente. Estudios realizados en células de la granulosa en cultivo de diferentes especies, tales como cerdo, conejo y rata establecen que el IGF-I además es un potente agente mitógeno. A pesar de toda la información que hay hasta el presente, no se ha dilucidado el ó los mecanismo(s) de acción del IGF-I, ni tampoco, se conocen las concentraciones intracelulares necesarias durante el desarrollo postnatal del ovario inmaduro que provocan la diferenciación bioquímica y fisiológica de las células de la granulosa. El modelo que más se ha empleado para estudiar la función del IGF-I hasta el presente, es la rata. Sin embargo, se desconoce aún cual es el mecanismo de acción de éste factor en los roedores durante el crecimiento y desarrollo del folículo.

Tampoco se sabe si el IGF-I *per se* tiene alguna función en la producción de esteroides gonadales antes de que se establezca el eje hipotálamo-hipófisis a los 35 dpp. en el ovario del ratón.

El presente trabajo explora un posible mecanismo de acción del IGF-I empleando como modelo células de la granulosa de ratones hembra inmaduras en cultivos celulares libres de suero.

Hipótesis:

El IGF-I induce la diferenciación fisiológica de las células de la granulosa del ovario inmaduro incrementando la producción de estrógenos *in vitro* independientemente de la acción de gonadotropinas. De esta manera, el efecto estimulador en la esteroidogénesis del IGF-I pudiera deberse a la acción del IGF-I sólo o a través de su acción sinérgica con las gonadotropinas. La presencia de agentes inhibidores de aromatasas, de un antiestrogénico (tamoxifén) o de agentes potenciadores de la acción de AMPc podrán bloquear y/o estimular su actividad.

IV. OBJETIVOS

- 1) Estandarizar el cultivo de las células de la granulosa de ovarios de ratón de 24 dpp estimuladas con FSH.
- 2) Dilucidar el efecto del IGF-I en la producción de estrógenos en los ovarios inmaduros.
- 3) Evaluar la acción de inhibidores y estimuladores de la función de segundos mensajeros, tales como ATP y la toxina del cólera, sobre la producción de 17 β -Estradiol.
- 4) Evaluar el efecto de inhibidores de la síntesis de estrógenos

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Reactivos químicos

Los reactivos utilizados fueron grado analítico. Todas las soluciones empleadas se describen en el apéndice (pág. 86).

1.1 Material

El material empleado fue esterilizado en ciclo húmedo a 120 Kg/cm², 40 minutos.

1.2 Animales

Se utilizaron ratones hembras de la cepa B6, de 24 dpp obtenidas del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los ratones se mantuvieron con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, a una temperatura de 24-25°C y se alimentaron con "Mouse/rat diet 7200", marca HARLAND y agua *ad libitum*.

1.3 Estimulación hormonal

Se inyectaron grupos de 8 a 10 hembras B6 de 24 dpp, en la región ventral intradérmicamente con FSH, conocida comercialmente como "FOLLIGON" de los laboratorios Internet International; la presentación comercial de "FOLLIGON" contiene 1000 UI de esta

hormona. Para inducir un buen crecimiento de las células de la granulosa, la estimulación se realizó inyectando 5 UI/día en 100 µl de agua destilada como vehículo durante tres días consecutivos.

2. Aislamiento de gónadas

Ratones hembra de la cepa B6 de 24 dpp; estimuladas como se describió en el punto anterior, se sacrificaron por dislocación cervical. Los ovarios de estos ratones se disectaron y se colocaron en una caja para cultivo de plástico de 40x12 mm(Nunclon) en 2.5 ml de medio 199(con sales de Hanks', L-glutamina y HEPES 25mM de los laboratorios GIBCO). Se eliminaron el tejido graso y los oviductos bajo un microscopio estereoscópico (modelo Stereomaster Fisher Scientific) en condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar horizontal.

2.1 Obtención de las células de la granulosa

Los ovarios se disgregaron manualmente en condiciones estériles y se pincharon con agujas para insulina bajo un microscopio estereoscópico hasta desmembrar completamente cada ovario. Las células dispersas se transfirieron a un tubo de ensaye de vidrio de 13 x 100 mm, se centrifugaron dos veces en medio 199 a

1000 rpm, 10 minutos, y se resuspendieron en 1 ml de medio McCoy's 5a (con L-glutamina de los laboratorios IN VITRO). Con esta técnica se obtuvo una fracción enriquecida en células de la granulosa (Figura 7).

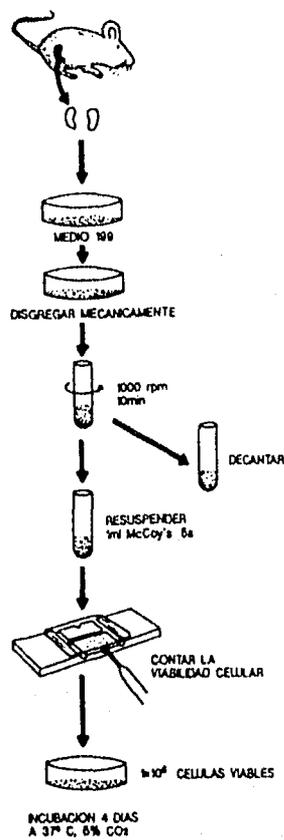


Figura 7 Esquema en que se ilustra la técnica empleada para aislar, disgregar y cultivar las células de la granulosa.

2.2 Viabilidad celular

Se tomaron 50 μ l de la suspensión celular obtenida, se colocaron en un tubo Eppendorf y se añadieron 50 μ l de azul de tripano al 0.9% en solución salina. De los 100 μ l se tomó una alícuota de 10 μ l y se colocaron en una cámara de Neubauer. El número de células viables se contó, tomando en cuenta los cuatro cuadrantes presentes en la cámara y se realizaron los cálculos de acuerdo a la fórmula que se describe a continuación.

VIABILIDAD= No. de células vivas observadas \times 2 \times 4 \times 10^4 \times Factor
de dilución= No. de células vivas/ml

Donde:

2= Dilución con el azul de tripano.

4= No. de cuadrantes contados.

10^4 = Factor de dilución para convertir a células por ml.

2.3 Cultivo celular

Se pipetearon 1×10^6 células viables en una caja de cultivo de plástico Nunclon (40x12 mm) conteniendo 1 ml de medio McCoy's 5a suplementado con 50 UI/ml de penicilina, 50 μ g/ml de sulfato de

estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 1 µg/ml de testosterona, FSH(200 ng/ml), ATP(1 mM), toxina del cólera(3 µg/ml), inhibidor de aromatasas(1 µg/ml) ó Tamoxifen(1 µg/ml) y en presencia ó ausencia de IGF-I(36 µg/ml). El diseño de cada experimento se muestra en las páginas 45 a 47.

a) Efecto del IGF-I a corto plazo

Los cultivos que se describen, se cultivaron 24 y 48 horas.

b) Efecto del IGF-I a largo plazo

Las células de la granulosa se cultivaron por 4 días en el caso de los cultivos con FSH, toxina del cólera, IGF-I y ATP, mientras que los cultivos con el inhibidor de la aromatasas ó tamoxifen se cultivaron por 4 y por 10 días. Para las incubaciones por 10 días el medio se cambió cada 4 días por medio fresco con y sin IGF-I(datos no mostrados). En ambos casos las células se cultivaron en una atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO₂ a 37 °C.

3. Almacenamiento de las muestras

El medio de cultivo se cosechó y se almacenó en tubos Eppendorf a -20°C, hasta realizar el RIA.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Experimento 1

	FSH	IGF - I	D.I.
Problema	200 ng/ml	36 ng/ml	1,2 y 4
Control	200 ng/ml	(-)	1,2 y 4

Experimento 2

	ATP	IGF - I	D.I.
Problema	1 mM	36 ng/ml	1,2 y 4
Control	1 mM	(-)	1,2 y 4

FSH = HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO
IGF-I = FACTOR SEMEJANTE A INSULINA TIPO I
D.I. = DIAS DE INCUBACION

DISEÑO EXPERIMENTAL

Experimento 3

	I.A.	IGF - I	D.I.
Problema	1 μ g / ml	36 ng/ml	1 , 2 4 y 10
Control	1 μ g / ml	(-)	1 , 2 4 y 10

Experimento 4

	Tamoxifen	IGF - I	D.I.
Problema	1 μ g / ml	36 ng/ml	1 , 2 4 y 10
Control	1 μ g / ml	(-)	1 , 2 4 y 10

I.A.= INHIBIDOR DE AROMATASAS
IGF-I= FACTOR SEMEJANTE A INSULINA TIPO I
D.I.= DIAS DE INCUBACION

DISEÑO EXPERIMENTAL

Experimento 5

	T.C.	IGF - I	D.I.
Problema	3 μ g / ml	36 ng / ml	1,2 y 4
Control	3 μ g / ml	(-)	1,2 y 4

Experimento 6

	IGF - I	D.I.
Problema	36 ng / ml	1,2 y 4
Control	(-)	1,2 y 4

T.C.= TOXINA DEL COLERA
IGF-I= FACTOR SEMEJANTE A INSULINA TIPO I
D.I.= DIAS DE INCUBACION

3.1 Viabilidad de los cultivos celulares

Para verificar que las células de la granulosa aún estaban vivas al final del periodo de cultivo se empleó la técnica histoquímica para detectar la actividad de la enzima 3 β -HSD. después de cosechar el medio de cultivo, las células fueron incubadas 1 hora a 37°C en un medio que contiene un cofactor como Nicotinamida adenindinucleótido, el colorante azul de tetrazolio y el sustrato para esta enzima dihidroepiandrosterona. Se empleó como control el ensayo sin la presencia de la hormona (sustrato) (Foto).



Fotografía que muestra el cultivo celular viable de las células de la granulosa. Las flechas señalan los acumulos de las células de la granulosa creciendo en cultivo celular.

3.2 Radioinmunoensayo (RIA)

El RIA es una técnica inmunológica que nos permite analizar pequeñas cantidades de hormonas esteroides presentes en un medio de cultivo en el orden de picogramos, por lo que es una prueba muy sensible y específica al hacer uso de anticuerpos. Se fundamenta en una reacción de competencia de un anticuerpo en este caso un anticuerpo contra estradiol (E_2) por su antígeno. Este último se encuentra presente en la muestra problema y se adiciona un antígeno marcado con tritio. De tal manera que si la concentración de E_2 en la muestra problema es mayor que el E_2 marcado, entonces las cuentas por minuto (cpm) registradas en el contador de centelleo serán mínimas. Si hay mayor unión de la marca con el anticuerpo, entonces las cpm obtenidas serán mayores es decir, la concentración de E_2 presente en la muestra problema es mínima.

DISEÑO GENERAL

No. tubo	Contenido
1-2	cpm totales
3-4	Unión no específica (rango: 1-3% cpm totales)
5-6	Unión máxima (rango: 30-50% cpm totales)
7-18	Curva estándar de E_2 a concentraciones decrecientes
19--	Muestras problema

Pasos a seguir:

1.- Preparación de los estándares(St) de estradiol

St1 400 pg de E₂: 4900 µl de buffer RIA + 100 µl de solución estándar de E₂.

St2 200 pg de E₂: 1 ml de buffer RIA + 1 ml de St1.

St3 100 pg de E₂: 1 ml de buffer RIA + 1 ml de St2.

St4 50 pg de E₂: 1 ml de buffer RIA + 1 ml de St3.

St5 25 pg de E₂: 1 ml de buffer RIA + 1 ml de St4.

St6 12.5 pg de E₂: 1 ml de buffer RIA + 1 ml de St5.

2.- Técnica

No. tubo	Muestra	Buffer RIA	Anticuerpo	[³ H]-E ₂ (80-90 µCi/ml)
1-2	---	900 µl	---	100 µl
3-4	---	400 µl	---	100 µl
5-6	---	200 µl	200 µl	100 µl
7-8	200 µl St1	---	200 µl	100 µl
9-10	200 µl St2	---	200 µl	100 µl
11-12	200 µl St3	---	200 µl	100 µl
13-14	200 µl St4	---	200 µl	100 µl
15-16	200 µl St5	---	200 µl	100 µl
17-18	200 µl St6	---	200 µl	100 µl
19---	50 µl muestra problema	150 µl	200 µl	100 µl

1.- Incubar a 37 °C por 1 hr.

2.- Colocar a 4 °C por 1 hr ó hasta 24 hrs.

- 3.- Añadir a todos los tubos con excepción de los tubos 1 y 2, 50 μ l de carbón activado al 0.6%.
- 4.- Centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos.
- 5.- Decantar sobrenadante en viales para centelleo líquido.
- 6.- Agregar 5 ml de líquido de centelleo a cada vial.
- 7.- Contar por 1 minuto en contador para centelleo, ajustado para detección de tritio.

VI. RESULTADOS

Los resultados son mostrados como aparecen en el diseño experimental.

1. Estandarización de la técnica

El modelo biológico empleado en la presente tesis, es el ratón *Mus musculus musculus* de la cepa B6, especie en la que se desconocen los mecanismo(s) molecular(es) de control de la producción de esteroides y de diferenciación de las células de la granulosa. A pesar, de la importancia biológica del ratón como modelo para la investigación, éste no ha sido usado en el pasado para estudios de endocrinología. Se probó entonces la técnica de disgregación celular propuesta por Magoffin y Erickson en 1981, en la cual se utilizan ovarios de rata y la disociación se efectúa en presencia de las enzimas colagenasa y DNasa. Sin embargo, debido posiblemente a que existen diferencias específicas entre especies, la aplicación del método propuesto por Magoffin y Erickson(1981) resultó inadecuado, ya que las gónadas del ratón B6 fueron muy sensibles a la acción de la colagenasa y la DNasa, las cuales provocaron la desintegración total de la membrana celular y como consecuencia la muerte celular de aproximadamente 50% de las células disgregadas. Debido a esto se probó el método de disgregación de las células de la granulosa en gradientes de

Percoll del 20% al 70%, hasta llegar al método descrito en la sección de la metodología, el cual había sido aplicado a ratas. La utilización de dicha técnica en el modelo biológico del ratón B6 mostró buenos resultados y se obtuvieron viabilidades celulares de un 75% a 85%.

El cultivo celular se realizó según el método propuesto por Magoffin y Erickson(1981) con las variantes descritas en la metodología. En los experimentos con ATP se usó HEPES a una concentración de 50 mM en lugar de 25 mM como en el resto de los experimentos, para contrarrestar la acidez ocasionada por el ATP.

1.1 Efectos del IGF-I a corto y largo plazo

En la figura 1 se muestran los resultados de la cuantificación de estradiol producido en los cultivos celulares de la granulosa de ratón durante los primeros 4 días de incubación en ausencia o presencia de 36 ng/ml de IGF-I. Los valores observados se reportan en ng/ml/célula en el medio de cultivo libre de suero. Observamos que la producción normal de estradiol en el grupo control, es mayor en todas las etapas estudiadas. En el grupo experimental el IGF-I tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de estradiol. Los niveles detectados en el grupo experimental al primero y segundo día de cultivo, son similares pero a los 4 días de incubación se

vió que la concentración de estradiol en este grupo experimental disminuye y es cuatro veces menor a la observada para el control a este mismo tiempo. Este efecto es contrario al efecto reportado en ratas en la producción de progesterona y andrógenos (Adashi EY, et al; 1985a).

Con la FSH (figura 2) se observó que el IGF-I en el ratón también tiene un acción sinérgica, ya que potencia la producción de estradiol a largo plazo (a los 4 días). Sin embargo, a las 24 horas de cultivo la síntesis de éste estrógeno es casi idéntica en ausencia y en presencia del IGF-I. A las 48 horas de incubación se vió que la producción de 17 β -estradiol disminuye a un tercio del valor normal detectado en el experimento control. A los 4 días de cultivo al adicionar el factor de crecimiento más FSH, se vió que la síntesis de estradiol se incrementó comparado al grupo control. En éste grupo se observó que la producción de 17 β -Estradiol en el grupo control, se incrementa en relación a los días de cultivo.

Si analizamos los datos en conjunto de los experimentos de IGF-I y de IGF-I+FSH. Se puede ver claramente que el IGF-I per se sin la intervención de FSH, tiene un efecto inhibitorio en la producción de estradiol. Mientras que al estar presente el FSH y el

IGF-I provocan una acción sinérgica, potenciando la producción de estradiol a los 4 días de incubación.

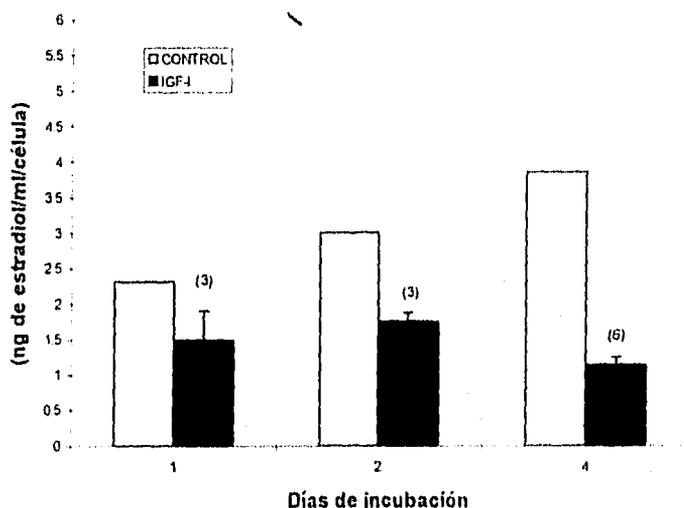


Figura 1. Concentraciones de 17β -Estradiol obtenidas en ng/ml/célula. Las columnas blancas representan los cultivos incubados sólo con medio McCoy's 5a, las columnas negras contienen sólo IGF-I. Los paréntesis indican el número de experimentos realizados. Cuando sólo se realizaron dos experimentos no se muestran las barras de desviación estándar. Las barras son el promedio +/- la desviación estándar.

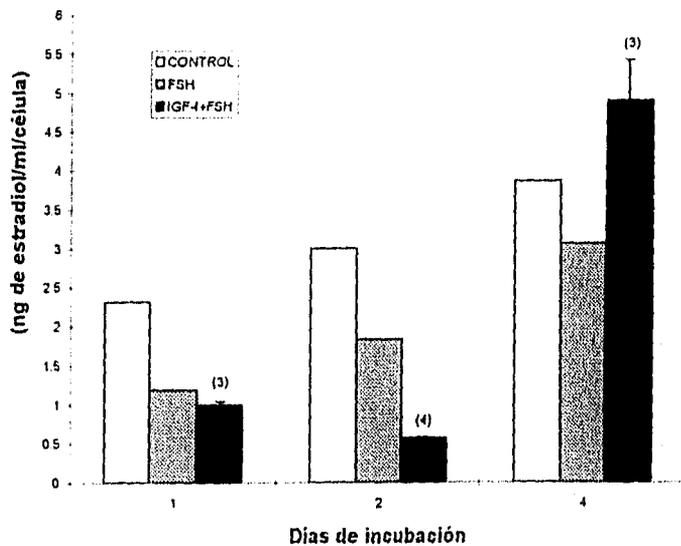


Figura 2. Concentraciones de 17β -Estradiol obtenidas en ng/ml/célula. Las columnas blancas representan los cultivos incubados sólo con testosterona, las columnas grises contienen FSH, las columnas negras contienen IGF-I+FSH. Los paréntesis indican el número de experimentos realizados. Cuando sólo se realizaron dos experimentos no se muestran las barras de desviación estándar. Las barras son el promedio +/- la desviación estándar.

Para determinar si el IGF-I tenía un efecto directo y/o indirecto en la producción de estradiol. Se emplearon inhibidores de la producción de estrógenos.

2. Efecto de los bloqueadores en la producción de estrógenos

a) Inhibidor de aromatasas

La figura 3, nos muestra las concentraciones de 17- β -Estradiol obtenidas, al probar la acción del IGF-I y el inhibidor de aromatasas 1, 4, 9(11)-Androstatrien-3, 17-diona sobre las células de cultivo. A las 24 y 48 horas de incubación, los niveles de 17- β -Estradiol detectados son similares en el grupo control y el experimental. Se observó que los niveles de 17- β -Estradiol se incrementaron cinco veces al cuarto día de incubación en el grupo control. Sin embargo, a los 10 días de incubación los niveles de este estrógeno descendieron hacia los niveles observados en los primeros días de cultivo éste grupo. Con el inhibidor de aromatasas se vió que a los 4 días de incubación hay una inhibición de casi al 50% de la producción de estradiol en el grupo experimental comparado con el control. Los niveles de 17- β -Estradiol a los 10 días de cultivo decayeron hacia los valores detectados a las 48 horas de cultivo igual que en el grupo control.

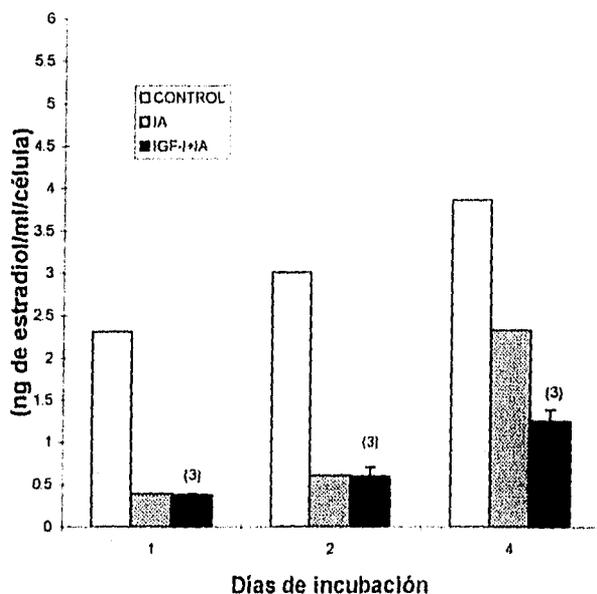


Figura 3. Concentraciones de 17 β -Estradiol obtenidas en ng/ml/célula. Las columnas blancas representan los cultivos incubados sólo con testosterona, las columnas grises contienen IA, mientras que las columnas negras contienen IGF-I+IA. Donde IA= Inhibidor de aromatasas. Los paréntesis indican el número de experimentos realizados. Cuando sólo se realizaron dos experimentos no se muestran las barras de desviación estándar. Las barras son el promedio +/- la desviación estándar.

b) Tamoxifén

En las células de la granulosa tratadas con tamoxifén (Figura 4), se ve que la presencia del factor semejante a insulina-I estimula la producción estrogénica a las 24, 48 horas de cultivo comparado con el control. A los 4 días la síntesis de estradiol es muy parecida tanto en el grupo control como en el experimental. A los 10 días, los niveles de estradiol son iguales a los detectados al segundo día de cultivo en presencia del tamoxifén.

Al analizar la acción de ambos inhibidores, es interesante ver que el IA abate la producción de estradiol a las 24 horas de cultivo (ver gráfica 3 para valores de 17 β -Estradiol detectados). A las 48 horas de incubación, los niveles de estradiol son un poco más altos que a las 24 horas. A los cuatro días de cultivo el inhibidor no parece tener ningún efecto en la producción de 17 β -Estradiol. Así mismo, observamos que el más potente inhibidor esteroidal es el inhibidor de aromatasa.

Se detectó que el tamoxifén, sólo presentó una actividad estrogénica y que la combinación de IGF-I+tamoxifén, tuvo un mayor efecto en la producción de estrógenos; este efecto es contrario a lo esperado.

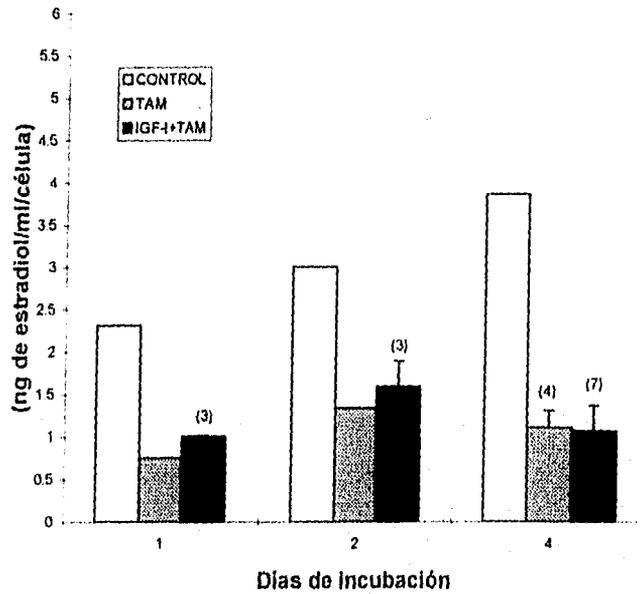


Figura 4. Concentraciones de 17β -Estradiol obtenidas en ng/ml/célula. Las columnas blancas representan los cultivos incubados sólo con testosterona, las columnas grises contienen TAM, mientras que las columnas negras contienen IGF-I+TAM. Donde TAM= Tamoxifén. Los paréntesis indican el número de experimentos realizados. Cuando sólo se realizaron dos experimentos no se muestran las barras de desviación estándar. Las barras son el promedio +/- la desviación estándar.

3. Agentes mediadores de la producción de esteroides

Los resultados de los experimentos con ATP (figura 5) muestran que la producción de estradiol se incrementó en función de los días de cultivo en el grupo control. Se observó que al primer día de incubación en el grupo experimental, hay un aumento en la síntesis de éste esteroide en presencia del IGF-I más ATP comparado con el control. En el segundo día hay una disminución en la producción de estradiol comparado con el cultivo a las 24 horas, los niveles en el grupo experimental y control son similares. Al cuarto día la síntesis de 17 β -Estradiol es muy similar al cuantificado en el primer día de cultivo.

Con la toxina del cólera (Figura 6), el efecto observado es similar al mostrado con el ATP. En el grupo control y experimental se vió que a las 24 y 48 horas, los niveles de estradiol son semejantes. Se observó que a los 4 días de incubación hay un incremento en la síntesis de estradiol en el grupo control. Sin embargo, los niveles de estradiol se incrementaron más en el grupo experimental.

Si se observan los datos en conjunto, se ve más claramente el incremento de la actividad estrogénica con el ATP, al primer y segundo día de incubación. La toxina del cólera, tuvo un claro

efecto en el aumento de la síntesis de estradiol en ausencia de IGF-I. A los 4 días de cultivo el efecto del IGF-I es mayor en presencia de la toxina.

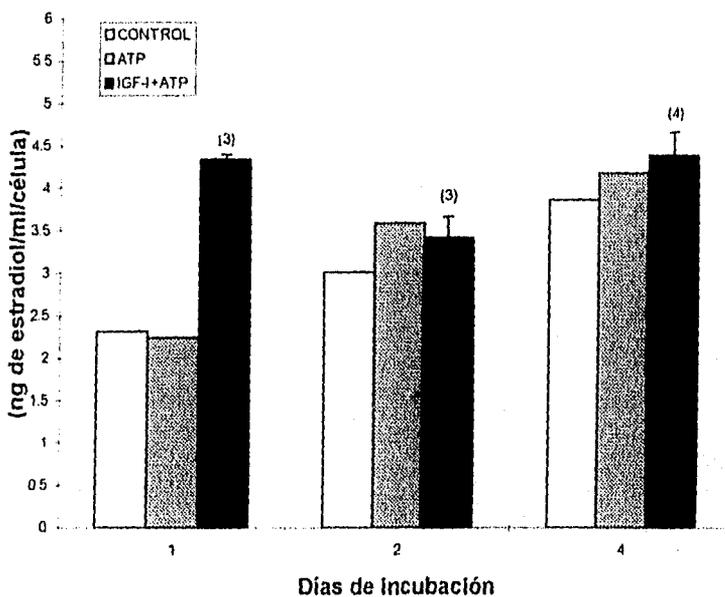


Figura 5. Concentraciones de 17β -Estradiol obtenidas en ng/ml/célula. Las columnas blancas representan los cultivos incubados sólo con testosterona, las columnas grises contienen ATP y las columnas negras contienen IGF-I+ATP. Los paréntesis indican el número de experimentos realizados. Cuando sólo se realizaron dos experimentos no se muestran las barras de desviación estándar. Las barras son el promedio +/- la desviación estándar.

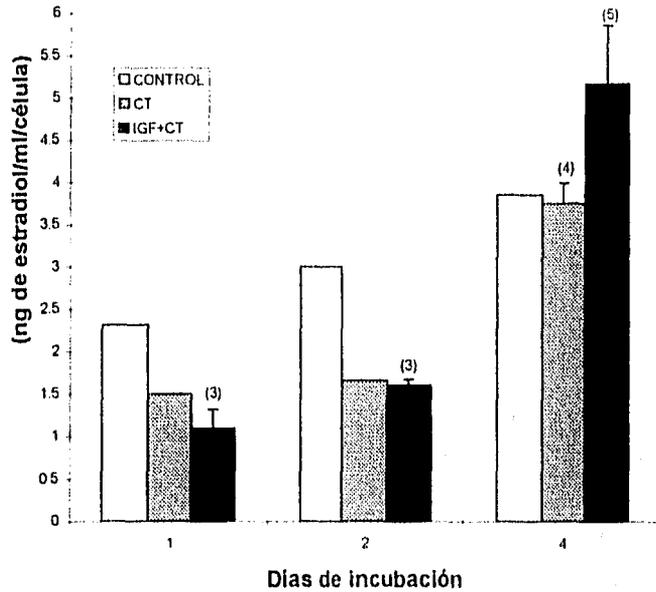


Figura 6. Concentraciones de 17β -Estradiol obtenidas en ng/ml/célula. Las columnas blancas representan los cultivos incubados sólo con CT, las columnas negras contienen IGF-I+CT. Donde CT= Toxina del cólera. Los paréntesis indican el número de experimentos realizados. Cuando sólo se realizaron dos experimentos no se muestran las barras de desviación estándar. Las barras son el promedio \pm la desviación estándar.

VII. DISCUSIÓN

El desarrollo óptimo de la maduración folicular de las células de la granulosa del ovario, depende de la interacción coordinada de gonadotropinas y factores de crecimiento o péptidos (Hsueh AJW, et al; 1984). Entre los péptidos que se conocen y cuya acción influye en la diferenciación de las células de la granulosa de rata y en la producción de esteroides *in vitro*, está el factor semejante a insulina tipo I (IGF-I) (Davoren J. B y Hsueh A. J. W; 1984, Davoren J. B et al; 1985, Adashi F. Y et al; 1984, Adashi et al, 1985a y b, Baranao J. L. S y Hammond J. M; 1984, Hammond et al; 1989, Wood A. M et al ; 1994, Casandra X et al ; 1991). En la actualidad se desconoce el mecanismo(s) celular(es) por el cual el IGF-I actúa en la maduración de las células de la granulosa. La mayoría de las investigaciones hechas hasta la fecha se han centrado en el modelo biológico de la rata y no se ha investigado el efecto del IGF-I en el ratón.

De estudios previos se sabe que durante el desarrollo del ovario infantil en la vía de maduración normal del folículo se requiere de la producción de estrógenos para que se de este proceso (Richards et al., 1987).

En este trabajo se investigaron los efectos del IGF-I en las células de la granulosa del ratón prepuber. Para determinar si este

péptido juega un papel en la producción de 17β -Estradiol en el ovario. Se cuantificó esta hormona como un criterio primordial indicador de la diferenciación bioquímica y fisiológica de las células de la granulosa en cultivo. Si bien en la mayor parte de los trabajos de investigación realizados en la rata se ha cuantificado progesterona y androsterona (Veldhuis J. D; 1989). Esto es debido a que la LH media la diferenciación de las células de la teca y la biosíntesis de andrógenos (Richards J. S; 1987), estos últimos son enviados del compartimento tecal a las células de la granulosa, donde es convertida la testosterona a 17β -Estradiol a través del sistema enzimático de la aromatasa (Dorrington et al; 1975). Así mismo, Richards y colaboradores en 1980 plantearon que la producción de estradiol en ratas inmaduras requería de altas concentraciones de LH. Si la liberación de LH fuese un requisito esencial para que la síntesis de estradiol, entonces cuantificar éste esteroide en ésta investigación no tendría ningún valor. Se sabe que la FSH induce la síntesis de la aromatasa y por lo tanto la producción de estrógenos. Sin embargo, en estudios previos en la cepa *Mus musculus domesticus* (Villalpando I et al, 1993) demostraron que el ovario infantil del ratón ya produce estradiol, en las etapas iniciales de formación de los folículos una semana antes de

la edad evaluada en ésta investigación (21 dpp).

Por otra parte, el hecho de que la mayor parte de los investigadores hayan cuantificado progesterona puede ser debido a dos razones: La primera, como un indicador funcional de un precursor metabólico de esteroides, dado que se ha planteado que las células de la granulosa no pueden producir 17 β -Estradiol. La otra posibilidad, es que la mayoría de los autores cuantificaron la producción de progesterona en las células que se luteinizaron espontáneamente en cultivo, ya que normalmente la progesterona es el producto principal de células luteinizadas que están produciendo progesterona activamente. Debido a que en éstas células se expresan primordialmente genes como la 20, 22-Liasa y 3 β -HSD (3 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa) que intervienen en la producción de progesterona (Dorrington et al., 1975.) Desde el punto de vista de la diferenciación bioquímica y fisiología de las células de la granulosa del ovario, éstas células son diferentes a las células de la granulosa no luteinizadas.

Por otro lado, en el ovario de roedores el eje hipotálamo-hipófisis, se establece a los 35 días después del nacimiento (Richards J. S; 1987). De los 15 a 30 días postpartum el ovario de roedores desarrolla folículos antrales. La liberación de

LH ocurre en la mañana o en la tarde en éste intervalo de tiempo ya que la primera ovulación no se da hasta los 32-35 días postpartum(Richards et al; 1987). Aparentemente la incapacidad de los folículos para ovular en respuesta a LH se debe a la esporádica liberación de ésta hormona la cual esta relacionada en parte con la incapacidad de éstos folículos para sintetizar estradiol(Richards et al, 1987).

En nuestro estudio observamos que las concentraciones de estradiol en los grupos control fue generalmente alta e independiente del control de la hipófisis. Esto pudiera explicarse debido a la presencia de insulina en el medio, la cual aún en bajas concentraciones, induce probablemente la actividad mitótica en las células de la granulosa; por otro lado también pudiera ser producto por la presencia del IGF-I endógeno, el cual induce una interacción temprana entre el compartamiento tecal en el que se sintetiza progesterona y testosterona y que ésta última al ser transferida a las células de la granulosa hayan inducido la expresión de los genes de la aromatasa.

Así mismo es posible que la producción temprana de éste esteroide sea independiente del control hipofisiario y que otros factores además de los de crecimiento tipo insulínico I y II, intervengan en la producción de estrógenos, aunque esto aún es tema

de discusión. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que hay diferencias específicas de especie.

En la presente estudio a pesar de que es necesario aumentar el número de experimentos en los grupo control, pero basados en investigaciones ya publicadas podemos hacer las siguientes obseravaciones.

El IGF-I sólo tiene un papel inhibitorio en la producción de estrógenos o no tuvo efecto. Esto quizá se deba a un problema de dosis. Sin embargo, en ésta investigación no se evaluo otra dosis de IGF-I.

Se ha visto, que la FSH administrada conjuntamente con el IGF-I aumentan la producción de progesterona y 20 α -dihidroprogesterona en rata. Así mismo, ambas progestinas potencian la síntesis de la aromatasa y por lo tanto, las concentraciones de estradiol se eleva (Adashi et al en 1984, 1985 y 1986).

Los resultados obtenidos en el presente estudio están de acuerdo con investigaciones realizadas en otras especies biológicas anteriormente estudiadas, en donde se demostró que el FSH tiene un efecto sinérgico con el IGF-I en la producción de

esteroides (Baranoa J. L. S y Hammond J. M., 1984, Adashi E. Y et al; 1985b y 1986b, Wood A. M et al; 1994).

El inhibidor de aromatasa usado en el presente estudio, actúa directamente inhibiendo ésta enzima y por lo tanto, la incapacidad de la producción de estrógenos (Brodie HMA; 1982). Esta observación apoya la hipótesis de que el control inicial de la producción de estrógenos probablemente sea independiente del control hipofisiario.

De estudios previos se sabe que el tamoxifén, compuesto no esterooidal que compite por el receptor de estrógenos sintetizados por la acción de la aromatasa, disminuye la producción de los mismos. Esta droga es utilizada para inhibir el cancer mamario, ya que las células que sufren metastasis están produciendo activamente 17β -Estradiol (Minni A; 1993, Rubens R. D; 1993 y Brodie A. M; 1994).

En este estudio, se observó que el tamoxifén tuvo el efecto opuesto al esperado, es decir presentó una potente actividad estrogénica. Este efecto se conoce en el caso de los andrógenos y estrógenos como efecto paradójico, donde a dosis mayores un estrógeno presenta una actividad estrogénica y a menor dosis una

función androgénica. Este efecto fue inicialmente descrito en diferentes especies de anfibios por Padoa en 1936.

El hecho de que el tamoxifén incrementó la producción de estradiol, plantea la posibilidad de que la acción del IGF-I posiblemente induce la expresión de la aromatasa y que ésta interactúa con otros péptidos. De tal forma que el efecto potenciador o sinérgico del IGF-I en presencia de FSH y LH sea debido a que hubiera una posible acción sumatoria de los efectos del IGF-I, por un lado a la interacción con hormonas proteicas como la FSH y por otro lado con hormonas esteroides y otros factores de crecimiento.

Tal es el caso del factor de transformación de crecimiento α (TGF α) y el TGF β , los cuales son producidos por las células de la teca. Estudios realizados (Lobb D. K y Dorrington J. H., 1989) con éstos factores en células de la granulosa de bovino, demostraron que la presencia en el medio de cultivo de TGF α y FSH provocaba un aumento en la actividad de la aromatasa, mientras que TGF β y FSH producía el efecto contrario, es decir una inhibición de la actividad de ésta enzima.

Los experimentos con ATP y con toxina del cólera fueron con el propósito de saber si la amplificación de estradiol en el medio de

cultivo era mediada por segundos mensajeros, al provocar una concentración elevada de AMPc en el interior de la célula. Esto para observar si hubiera algún incremento en la síntesis de estradiol al adicionar el IGF-I.

El ATP fue agregado como tal en el medio de cultivo para que el metabolismo *per se* de la célula lo convirtiera a AMPc y fuera incorporado a ésta. Los resultados arrojados de éste experimento muestran el efecto estimulador de éste compuesto. Se observó que existe una estimulación de la aromatasa y una elevación en las concentraciones de estradiol. Apoyando la hipótesis de que uno de los posibles mecanismos implicados en los efectos amplificadores del IGF-I, sea a través de segundos mensajeros. Los presentes resultados están de acuerdo con las observaciones realizadas por otros grupos (Richards JS et al; 1979 y Adashi EY; 1986).

La toxina del cólera inhibe a la GTPasa que hidrolisa la unión GTP y la proteína Gs (proteína estimuladora de la adenilato ciclasa) pasando al GTP a GDP, desactivando la estimulación del adenilato ciclasa y como consecuencia la vida del complejo Gs-GTP se prolonga de tal modo que la célula produce AMPc sin cesar. En nuestros estudios observamos que es a los cuatro días de cultivo cuando se presenta un aumento en la síntesis de estradiol en el grupo experimental, lo cual sugiere que el efecto observado sea debido a

que los niveles de AMPc son mayores a los presentes en las células de la granulosa en los primeros días de cultivo.

El hecho de que éste efecto se haya observado hasta los cuatro días y no antes, pudiera ser debido a un efecto acumulativo de las concentraciones de estradiol. Así mismo, observamos que en ambos experimentos con ATP y con la toxina del cólera hay un aumento progresivo de estradiol producido con respecto a los días de cultivo en lo que se refiere a los grupos controles de ambos experimentos. Esto puede ser debido a que se ha planteado que el AMPc juega un papel intermediario en la producción de estrógenos (Richards JS et al; 1979 y Adashi EY; 1986). Donde la toxina del cólera incrementaría las concentraciones de AMPc.

Lo anterior nos hace pensar que quizá el incremento de esteroides en los que se involucra el IGF-I estén mediados a través de un mecanismo de segundos mensajeros. Sin embargo, hace falta más experimentación para apoyar o refutar ésta hipótesis.

VIII. CONCLUSIONES

- 1.- La producción de 17β -Estradiol en las células de la granulosa a los 24 dpp. en el ratón, aparentemente es independiente del control hipofisiario.
- 2.- El IGF-I por si sólo, no tiene ningun efecto directo en la síntesis de estradiol.
- 3.- El IGF-I en presencia de FSH, ATP y toxina del cólera amplifican la producción de estradiol *in vitro* al igual que en otras especies.
- 4.- La acción del IGF-I es mediada probablemente a través de un mecanismo de segundos mensajeros, aunque pudiera haber otro(s) mecanismo(s) alternativo(s).

IX. BIBLIOGRAFÍA

Akhtar M and Skinner SJM. (1986). The intermediary role of a 19-oxoandrogen in the biosynthesis of oestrogen. *Biochem. J.* 109: 318-321.

Adashi EY, Resnick CE, Svoboda ME and Van Wyk JJ. (1984). A novel role for somatomedin-C in the cytodifferentiation of the ovarian granulosa cell. *Endocrinology* 115: 12227-12229.

Adashi EY, Resnick CE, Svoboda ME and Van Wyk JJ. (1985a). Somatomedin-C synergizes with follicle-stimulating hormone in the acquisition of progesterone biosynthetic capacity by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 116: 2135-2142.

Adashi EY, Resnick CE, Brodie AMH, Svoboda ME and Van Wyk JJ. (1985b). Somatomedin-C mediated potentiation of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 117: 2313-2320.

Adashi EY, Resnick CE, Svoboda ME and Van Wyk JJ. (1986a). Follicle-stimulating hormone enhances somatomedin-C binding to cultured rat granulosa cells; evidence for cAMP dependence. *J. Biol. Chem.* 261: 3923.

Adashi EY, Resnick CE, Svoboda ME and Van Wyk JJ. (1986b). Somatomedin-C an amplifier of follicle-stimulating hormone action; enhanced accumulation of 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 118: 149.

Adashi EY, Resnick CE, Hernández ER, Svoboda ME and Van Wyk JJ. (1988). Characterization and regulation of a specific cell membrane receptor for somatomedin-C/insuline-like growth factor I in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 122: 194-201.

Adashi EY, Resnick CE, Hernández ER, Marjorie E, Hoyt SE, Clemmons DR, Lung PK and Van Wyk JJ. (1989). Rodent studies on the potential relevance of insuline-like growth factor(IGF-F) to ovarian physiology. In: Growth factors and the ovary. Anne N. Hirshfield(ed). Plenum Press, Nueva York.

Amsterdam A, Koch Y, Lieberman ME and Lidner HR. (1975). Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *J. Cell Biol.* 67: 894-900.

Armstrong DT and Papkoff H. (1976). Stimulation of aromatization of exogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rats *in vivo* by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* **99**: 1144-1151.

Armstrong DT. (1979). Alterations of progesterone metabolism in immature rat ovaries by luteinizing hormone. *Biol. Reprod.* **21**: 1025-1033.

Austin CR y Short RV. (1982a). El hipotálamo. En: Procesos de reproducción en los mamíferos. Ediciones científicas. La Prensa Médica Mexicana S.A. pp. 28-71.

Austin CR y Short RV. (1982b). Ovogénesis y ovulación. En: Procesos de la reproducción en mamíferos. Ediciones científicas. La Prensa Médica Mexicana S.A. pp. 15-27.

Baranao JLS and Hammond JM. (1984). Comparative effects of insulin and insulin-like growth factors on DNA synthesis and differentiation of porcine granulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **124**: 484-490.

Brewer MT, Stetter GT and Squire CH. (1988). Cloning characterization and expression of a human insulin-like growth factor binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**: 1289-1297.

Brodie HMA. (1982). Overview of recent development of aromatase inhibitors. *Cancer Research(suppl)*. **42**: 3314s-3314s.

Bridie AM. (1994). Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **49(4-6)**: 281-287.

Byskov AG and Lintern-Moore S. (1973). Follicle formation in the immature mouse ovary: the role of the rete ovarii. *J. Anat.* **116**: 207-217.

Byskov AG. (1975). The role of the rete ovarii in meiosis and follicle formation in the cat, mink and ferret. *J. Reprod. Fert.* **45**: 201-209.

Byсков AG and Shakkebak NF. (1977). Influence of ovarian surface epithelium and rete ovarii on follicle formation. *J. Anat.* 123: 77-86.

Byсков AG. (1978). The anatomy and ultrastructure of the system in the fetal mouse ovary. *Biol. Reprod.* 19: 720-735.

Cassandra X, Constantino P, Landis PK and Kostyo JL. (1991). Insuline-like growth factor-I stimulates steroidogenesis in rabbit luteal cells. *Endocrinology* 128: 1702-1708.

Clemmons DR, Thissen JP and Maes M. (1989). Insuline-like growth factor-I(IGF-I) infusion into hypophysectomized or protein deprived rats induces specific IGF binding proteins in serum. *Endocrinology* 125: 2967-2972.

Chambers DA and Studds JD. (1976). Cyclic nucleotid proteins detected by photoaffinity labeling in S49 lymphocyte cells. In: Proceedings of the tenth international congress of biochemistry. Hamburg, Abstr. 11-1-414.

Chang SC, Jones JD, Ellefson RD and Ryan RJ. (1976). The porcine ovarian follicle I. Selected chemical analysis of follicular fluid at different developmental stages. *Biol. Reprod.* 15: 321-328.

Channing CP and Seymour JE. (1970). Effects of dibutyryl dyclic 3',5'-AMP and other agents upon luteinization of porcine granulosa cells in culture. *Endocrinology.* 87: 165-169.

Chiquione AD. (1954). The identification, origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat. Rec.* 118: 135-145.

Daughaday WH and Rotwein PS. (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocrine Rev.* 10: 68-91.

Davoren JB and Hsueh AJW. (1984). Insulin enhances FSH-stimulated steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 35: 97.

Davoren JB, Hsueh AJW and Li CH. (1985). Somatomedin-C augments FSH-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Am. J. Physiol.* **249**: E26.

Davoren JB, Kasson BG, Li CH and Hsueh AJW. (1986). Specific insulin-like growth factor(IGF)I-and II-binding sites on rat granulosa cells: relation to IGF action. *Endocrinology* **119**: 2155-2162.

Doisy EA, Veler CD and Thayer S. (1929). Folliculin from urine of pregnant women. *Am. J. Physiol.* **90**: 329-330.

Dorrington JH; Moon YS and Armstrong DT. (1975). Estradiol-17 beta biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* **97**: 1328-1331.

Erickson GF and Ryan KJ. (1976). Stimulation of testosterone production in isolated rabbit thecal tissue by LH/FSH, Dibuteryl cyclic AMP, $PGF_{2\alpha}$ and PGE_2 . *Endocrinology*. **99**: 452-458.

Eshkol A and Lunenfold B. (1972). Gonadotropic regulation of ovarian development in mice during infancy. In: Gonadotropins. Saxena BB, Beling CG and Gandy HM(eds). Wiley, New York. pp. 335-346.

Fletcher PW, Kaltenbach CC and Haley BE. (1976). Photoaffinity labeling of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate binding sites in ovine corpora lutea. In: Ninth annual meeting, society for the study of reproduction. Abstr. 40.

Fortune JE and Armstrong DT. (1977). Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrus rat follicles. *Endocrinology* **100**: 1341-1347.

Ganong FW. (1988). Hipófisis. En: Fisiología Médica. El manual moderno S.A. de C.V.(ed). México D.F. pp. 341-353.

Goodman AL and Hodgen GD. (1983). The ovarian tread of the primate menstrual cycle. *Recent Prog. Horm. Res.* **39**: 1-73.

Gore-Langton and Armstrong TD. (1988). Follicular steroidogenesis and its reproduction. E. Knobilys; J. Nell, et al(ed).Raven Press Ltd, New York. pp. 331-38

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Gruenwald P. (1942). The development of the sex cords in the gonads of man and mammals. *Am. J. Anat.* 70: 359-397.

Gwynne JT and Strauss III JF. (1982). The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr. Rev.* 5: 299-329.

Hammond JM, Mondschein JS and Canning SF. (1989). Insulin-like growth factors (IGFs) as autocrine/paracrine regulators in the porcine ovarian follicle. In: Growth factors and the ovary. Anne N. Hirshfield (ed). Plenum Press, Nueva York.

Horbes TR. (1942). On the fate of the medullary cords of the human ovary. *Contr. Embryol.* 30: 11-15.

Hillier SG, Zelesnik AJ and Ross GT. (1978). Independence of steroidogenic capacity and luteinizing hormone receptor induction of developing granulosa cells. *Endocrinology.* 102:937-946.

Hsueh AJ, Adashi EY, Jones PBC and Welsh TH. (1984). Hormonal regulation of the differentiation of culture ovarian granulosa cells. *Endocr. Rev.* 5: 76-127.

Ireland JJ and Richards JS. (1978). A previously underscribed role for luteinizing hormone (LH:hCG) on follicular cell differentiation. *Endocrinology.* 102: 1458-1465.

Isgaard J, Nilsson A, Nilsson A, Vikman K and Isaksson OG. (1989). Growth regulates the level of insulin-like growth factor-I mRNA in rat skeletal muscle. *J. Endocrinology* 120: 107.

Jones PBC and Hsueh AJW. (1982). Pregnenolone biosynthesis by cultured granulosa cells: modulation by follicle-stimulating hormone and gonadotrophin releasing hormone. *Endocrinology* 111: 713-721.

Kellie AE. (1984). Structure and nomenclature. In: Biochemistry of steroid hormones. Makin HLJ (ed). Blackwell Scientific, Oxford, J. K. pp. 1-19.

Kellis JT Jr and Vickery LE. (1987). Purification and characterization of human placental aromatase cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 262: 4413-4420.

Lidner HR, Tsafiri A, Lieberman MF, Zor V, Koch Y, Bauminger S and Barnes A. (1974). Gonadotropic action on cultured graafian follicles: Induction of maturation division of the mammalian oocyte and differentiation of the luteal cell. *Rec. Prog. Horm. Res.* 30: 79-126.

Lobb DK y Dorrington JH. (1989). Bovine thecal cells secrete Transforming growth factor alfa y beta. In: Growth factors and the ovary. Anne N. Hirshfield(ed). Plenum Press, Nueva York.

Lostron AJ and Johnson RE. (1966). Amounts of interstitial cell-stimulating hormone and follicle-stimulating hormone required for follicular development, uterine growth an ovulation in the hypophysectomized rat. *Endocrinology.* 79: 991-996.

MacCorquodale DW, Thayer SA and Doisg EA. (1936). The isolation of the principal estrogenic substance of liquor folliculi. *J. Biol. Chem.* 115: 435-448.

Makris A and Ryan KJ. (1977). Aromatase activity of isolated and recombined hamster granulosa and theca cells. *Steroids* 29: 65-72.

Manni A. (1993). Clinical use of aromatase inhibitors in the treatment of breast cancers. *J. Cell Biochem. Suppl.* 17G: 242-246.

Mendelson CR, Durham C, Evans C and Simpson ER. (1985). The induction of aromatase activity in estrogen-producing cells is mediated by the increased synthesis of aromatase cytochrome P-450. *67th. Annual Meeting of the Endocrine Society* p. 77(Abstr. 307).

Merchant-Larios H. (1975). Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev. Biol.* 44: 1-21.

Merchant-Larios H. (1976). The role of germ cells in the morphogenesis and cytodifferentiation of the rat ovary. In: Progress in Differentation Research. Muller-Berat(ed). North Holland Pub. Co., Amsterdam. pp. 463-472.

Merchant-Larios H. (1979). Origin of the somatic cells in the rat gonad: an autoradiographic approach. *Ann. Biol. Anim. Biophys.* 19: 1219-1229.

Merchant-Larios H and Centeno B. (1981). Morphogenesis of the ovary from the sterile W/W^z mouse. In: Advances in the Morphology of Cells and Tissues. Acosta Vidrio E, Galina MA(eds), New York. Alan R Liss Inc. pp. 383-392.

Merchant-Larios H, Popova I and Reyss-Brion M. (1984). Early morphogenesis of chick gonad in the absence of mesonephros. *Develp, Growth and Diffe.* 25(5): 403-417.

Merchant-Larios H. (1984). Germ and somatic interactions during gonadal morphogenesis. In: Ultrastructure of reproduction. Van Blerkom J and Motta PM(eds). Martinus Nijhoff Publishers, Boston. pp. 19-30.

Merchant-Larios H and Chimal MJ. (1989). The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. In: Developments in ultrastructure of reproduction. Alan R. Liss Inc. pp. 55-63.

Midgley Jr. AR. (1972). Gonadotrophin binding to frozen sections of ovarian tissue. In: Gonadotropins. Saxena BB, Beling Cg y Candy HM(eds). Wiley-Interscience, New York. pp. 248-260.

Moon YS, Dorrington JH and Armstrong DT. (1975). Stimulating action of follicle stimulating hormone on estradiol-17beta secretion by hypophysectomized rat ovaries in organ culture. *Endocrinology.* 97: 244-247.

Murphy LJ, Bell GI and Friesen HG. (1987). Tissue distribution of insuli-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology* 120: 1279.

Nilson L, Rosberg S and Ahren K. (1974). Characteristics of the cyclic 3',5'-AMP formation in isolated ovarian fillicles from PMSG-treated immature rats after stimulation in vitro with gonadotropins and prostanglandins. *Acta Endocrinol.* 77: 559-594.

Padoa E. (1936). Effetto paradossale masculinizzazione sulla differenziazione sessuale di giniri *Rana esculenta* tratata con ormone follicolare. *Monit. Zool. Ital.* 47: 255.

Peters H. (1978). Folliculogenesis in mammals. In: The Vertebrate Ovary. Jones Er(ed). New York and London: Plenum Press. pp. 121-144.

Rajendran KC, Hwang J and Menoir KMJ. (1983). Binding, degradation and utilization of plasma high density and low density lipoproteins for progesterone production in cultured rat luteal cells. *Endocrinology* 112: 1746-1753.

Rao MC, Richards JS, Midgley AR Jr and Reicher LE. Jr. (1977). Regulation of gonadotropin receptors by LH in granulosa cells. *Endocrinology* 101: 512-523.

Richards JS, Irland JJ, Rao ML, Bernath GA, Midgley AR Jr and Reichert LE. Jr. (1976). Ovarian follicular development in the rat: Hormone receptor regulation by estradiol, follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Endocrinology* 99: 1562-1570.

Richards JS, Jonassen JA, Rolfes AI, Kersey K and Reichert LE Jr. (1979). Adenosine 3',5'-monophosphate, luteinizing hormone receptor, and progesterone during granulosa cell differentiation: effects of estradiol and follicle stimulating hormone. *Endocrinology*. 104: 765-773.

Richards JS. (1980). Maturations of ovarian follicles: Actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol. Rev.* 60: 51-89.

Richards JS, Jahnsen T, Hedin L, Lifka J, Ratoosh S, Durinca JM and Goldring NB. (1987). Ovarian follicular development from physiology to molecular biology. In: Recent progress in hormone research. pp. 231-276.

Rubens RD. (1993). Improving treatment for advanced breast cancer. *Cancer surv.* 18: 199-209.

Schreiber JR, Reid R and Ross GT. (1976). A receptors-like testosterone binding protein in ovaries from estrogen-stimulated hypophysectomized immature female rats. *Endocrinology* 98: 1206-1213.

Schwarzel WC, Kruggel W and Brodie HJ. (1973). Studies of the mechanism of the estrogen biosynthesis. VIII. The development of inhibitors of the enzyme system in human placenta. *Endocrinology* 92: 866-880.

Selstam G, Rosberg S, Liljekvist J, Gronquist L, Perklen T and Ahren K. (1976). Differences in action of LH and FSH on the

formation of cyclic AMP in prepubertal rat ovary. *Acta Endocrinol.* **81**: 150-164.

Shalgi R, Kraicer P, Renoir A, Pinto M and Soferman N. (1973). Proteins of human follicular fluid: the blood-follicular barrier. *Fertil. Steril.* **24**: 429-434.

Shamasaki S, Shimonaka M and Ui M. (1990). Structural characterization of a follicular-stimulating hormone action inhibitor in porcine ovarian follicular fluid. Its identification as the insulin-like growth factor-binding protein. *J. Biol. Chem.* **252**: 2198-2202.

Short RV. (1961). Steroid concentrations in the follicular fluid of mares at various stages of the reproductive cycle. *J. Endocrinol.* **22**: 153-163.

Simpson ER, Rochelle DB, Carr BR and MacDonald PC. (1980). Plasma lipoproteins in follicular fluid of human ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **51**: 1469-1471.

Strauss III JF, Schuler LA, Rosenblum MF and Tanaka T. (1981). Cholesterol metabolism by ovarian tissue. *Adv. Lipid Res.* **18**: 99-157.

Stryer L. (1988). *Bioquímica*. Macarulla MDJ(ed). Reverté. México. pp. 988.

Sussenbach JS and Steenbergh PH. (1991). Structural and regulatory aspects of the human genes encoding IGF-I and II. In: molecular biology and physiology of insulin and insulin-like growth factors. Raizada MK y Roith DL(eds). Plenum Press. New York. pp. 1-14.

Toaff ME, Stauss III JF and Hammond JM. (1983). Regulation of cytochrome P-450_{esc} in immature porcine granulosa cells by FSH and estradiol. *Endocrinology* **112**: 1156-1158.

Thompson EA Jr and Siiteri PK. (1974). Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstendione. *J. Biol. Chem.* **249**: 5364-5372.

Torrey TW. (1945). The development of the urogenital system of the albino rat II the gonads. *Am. J. Anat.* **76**: 375-397.

Upadhy S and Zamboni L. (1981). The role of mesonephros in the development of the mouse testis and its excurrent pathways. in: Development and Function of reproductive Organs. V workshop on development and function of the reproductive organs. Copenhagen Byskov AG, Peters H(eds). Amsterdam. Excerpta Medica. pp. 18-27.

Veldhuis JD, Furlanetto RW, Juchter D, Garny JC and Veldhuis P. (1985). Trophic actions of human somatomedin C/insulin-like growth factor 1 on ovarian cells: *in vitro* studies with swine granulosa cells. *Endocrinology* **116**: 1235-1242.

Veldhuis JD. (1989). Regulatory actions of the Insulin-like growth factor, IGF-I(Somatomedin-C) on sterol metabolism by ovarian cells. In: Growth Factors and the Ovary. Anne N. Hirshfield(ed). Plenum Press, Nueva York.

Villalpando I, Nishioka Y and Taketo T. (1993). Endocrine differentiation of the XY sex-reserved mouse ovary during postnatal development. *Steroid. Biochem. Molec. Biol.* **45**: pp. 265-273.

Wood WI, Cachianes G, Henzel WJ, Winslow GA, Spences SA, Hellmiss R, Martin JL and Baxter RC. (1988). Cloning and expression of the GH dependent insulin-like growth factor binding protein. *Mol. Endo.* **2**: 1176-1185.

Wood AM, Lambert A, Hooper MAK, Mitchell GG and Robertson WR. (1994). Exogenous steroids and the control of oestradiol secretion by human granulosa lutein cells by follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-I. *Human Reproduction.* **9**: 19-23.

Zamboni L and Bézard J. (1979). The role of mesonephros in the development of the sheep fetal ovary. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* **19**: 1153-1178.

Zeleznick AJ, Midgley AR and Reichert LE. (1974). Granulosa cell maturation in the rat: Increasing binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone *in vivo*. *Endocrinology* **95**: 818-825.

Zmigrod A, Lidner HR and Lamprecht SA. (1972). Reductase pathways of progesterone metabolism in the rat ovary. *Acta Endocrinol. (Copenh)* **69**: 141-152.

Zoller LC and Weisz J. (1978). Identification of cytochrome P-450 and its distribution in the membrana granulosa of the preovulatory follicle using quantitative cytochemistry. *Endocrinology* **103**: 310-313.

Zoller LC and Weisz J. (1979). A quantitative cytochemical study of glucose-6-phosphate dehydrogenase and ⁶-3 - hydroxysteroid deshydrogenase follicle of the rat. *Histochemistry* **62**: 125-135.

X. APENDICE

- Solución de IGF-I

Se preparó una solución de IGF-I de $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se almacenó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ en alícuotas de $4 \mu\text{l}$. Cada alícuota se adicionaba a 11 ml de medio Mc'Coys 5a para llegar a una concentración final de $36.3 \mu\text{g}/\text{ml}$.

- Soluciones concentradas de Testosterona, Inhibidor de aromatasas y Tamoxifén

Se prepararon soluciones de testosterona, inhibidor de aromatasas y de tamoxifén, cada una con una concentración de $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ y se almacenaron en alícuotas de 1 ml a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Se suplementaban 11 ml de medio Mc'Coys 5a con $11 \mu\text{l}$ de la solución deseada para llegar a una concentración final de $1 \mu\text{g}/\text{ml}$.

- Toxina del cólera

0.5 mg de toxina del cólera marca SIGMA la cual se diluyó en 1 ml de medio Mc'Coys 5a para obtener una solución de $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, misma que se almacenó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Se adicionaron $66 \mu\text{l}$ de ésta a 11 ml de medio Mc'Coys 5a para tener una concentración de $3 \mu\text{g}/\text{ml}$.

- FSH

Alcuotas de una solución de FSH con una concentración de 32 UI/ml , se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. 11 ml de medio Mc'Coys 5a se suplementaron con 34.4 μl de solución de FSH para obtener una concentración final de 0.1 UI/ml .

PREPARACION Y ALMACENAJE DE REACTIVOS PARA RIA

1.- Anticuerpo

El anticuerpo antiestradiol se diluye en buffer para RIA según las indicaciones del fabricante. La solución del anticuerpo se debe guardar a -70°C lo más concentrado posible y en pequeños volúmenes de acuerdo a los requerimientos de cada usuario (**evitar congelar y descongelar; bajo éstas condiciones la solución es estable durante aprox. 6 meses**). Justo antes de su uso la solución se descongela y se diluye adicionando 0.1 ml en 14 ml de buffer RIA. Debe mantenerse a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se empleé (**evitar congelar**).

2.- Solución madre de estradiol

10 mg/100ml = 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en alcohol (**guardar a 16°C , no congelar**).

3.- Estandar de estradiol

Añadir 50 µl de solución madre y llevar a 50 ml con buffer RIA en un matraz aforado (conc. final $100 \text{ }^{125}\text{I}/\text{ml} = 0.1 \text{ }^{125}\text{I}/\text{ml}$). La solución es estable durante un mes en refrigerador (evite congelarla. Atemperar por 20 a 30 min antes de usar).

4.- Carbón activado

Suspender 0.6 g de carbón activado en 100 ml de Buffer RIA. Prepararse al momento de usarlo y mantengase en suspensión con agitación magnética.

5.- Buffer RIA (hipertónico)

La composición del Buffer RIA hipertónico es la siguiente:

H ₂ O	1000 ml	500 ml
Gelatina Difco	1 gr	500 mg
Azida de sodio	1 gr	500 mg
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	8.7 gr	4.35 gr
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5.4 gr	2.7 gr
NaCl	9 gr	4.5 gr

Calentar aprox. 100 ml de agua (sin que hierva) y disolver la gelatina con agitación; mientras tanto disolver las sales en 300 ml

de agua. Agregar la gelatina a la solución de sales y aforar al volumen deseado mezclando con cuidado para evitar la producción de espuma.

6.- Buffer RIA(isotónico)

Diluir 100 ml de buffer hipertónico agregar 55 ml de agua destilada(pH final= 7.2).

7.- Líquido de centelleo

Composición:

Dimetil Popop($C_{26}H_{26}N_2O_2$)	2 gr
2,5-Difeniloxazoleppo	40 gr
Tritón X-100	3330 ml
Tolueno	6670 ml

Disolver primero el difenil en tolueno con agitación y después agregar el dimetil y el tritón.