

24/11



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

"ESTUDIO DE LA ESTEROIDOGENESIS EN EL  
OVARIO FETAL DE BOVINO".

**T E S I S**

Que para obtener el título de :

**B I O L O G O**

presenta:

**GEORGINA ALVAREZ FERNANDEZ**



**FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1989



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

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

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

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

## INDICE

	página
RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	2
OBJETIVO .....	27
MATERIAL Y METODOS.....	28
RESULTADOS .....	34
DISCUSION Y CONCLUSIONES .....	41
REFERENCIAS .....	49

## RESUMEN.

Con el propósito de observar si en el ovario fetal de bovino existen poblaciones celulares con distintas capacidades esteroidogénicas, se estudió la biotransformación de precursores marcados en corteza y médula ováricas.

Se utilizaron fetos de bovino de 47 a 75 días de gestación (4-10 cm de long. C-R). Los ovarios fueron disecados, separando cuidadosamente corteza y médula, para disgregar las células de ambas regiones con tripsina. Las suspensiones celulares obtenidas, se incubaron aisladamente en medio Dulbecco-albúmina con testosterona [ $1,2,6,7-^3\text{H}$ ] en tres concentraciones diferentes o pregnenolona [ $7-^3\text{H}$ ]. Los esteroides fueron extraídos y después separados por cromatografía en placa fina y en columna.

Al utilizar testosterona como precursor, el producto principal fue  $17\beta$ -estradiol, cuya síntesis se consideró como índice de actividad de la aromatasa. Con base en los resultados obtenidos, tanto la corteza como la médula ováricas son capaces de aromatizar testosterona a estradiol y no hay diferencias significativas entre ambas regiones, tomando los datos en conjunto. Asimismo se observó una mayor actividad de la aromatasa tanto en corteza como en médula de ovarios de embriones de 4 a 5 cm de long. C-R, la cual fue decayendo en ovarios de embriones de 6 a 7 cm de long. C-R en adelante.

Cuando se empleo pregnenolona [ $7-^3\text{H}$ ] como sustrato, se estableció la relación  $\text{P4} + \Delta^4$ / DHEA como índice de la actividad del complejo enzimático  $\Delta^5-4$ ,  $3\beta$ -OHSDH, que fue mayor en médula con respecto a corteza de los ovarios estudiados. Esto fue confirmado por histoquímica, con la cual se localizó la actividad de dicho complejo enzimático en la médula subcortical.

Además, los resultados del presente trabajo demuestran que el ovario fetal de bovino es esteroidogénicamente activo desde etapas tempranas del desarrollo.

## INTRODUCCION.

La reproducción, que en el caso de los vertebrados es sexual, es un proceso fundamental para todos los seres vivos, ya que gracias a ella las especies pueden perpetuarse. Además, la reproducción sexual favorece la recombinación genética, que a su vez permite una mayor capacidad adaptativa de los organismos que la presentan, ante los cambios del medio.

Ahora bien, para que la reproducción sexual pueda llevarse a cabo, se requiere en primer término de la diferenciación de células germinales especializadas, distintas de las células somáticas y que se denominan gametos (óvulos en la hembra y espermatozoides en el macho). Al unirse un óvulo con un espermatozoide (fecundación), se inicia la formación de un organismo, quedando determinado desde este momento, el sexo genético del mismo, que se expresará fenotípicamente en etapas posteriores del desarrollo, en las que juegan un papel crucial las hormonas sexuales.

Tanto la formación de gametos como la secreción de hormonas son funciones fundamentales de las glándulas sexuales o gónadas que, en su etapa fetal, serán los órganos que utilizaremos para realizar este trabajo, cuyo objetivo principal es el estudio de la esteroidogénesis ovárica fetal.

### Origen y formación de las gónadas.

Tanto las gónadas femeninas (ovarios) como las masculinas (testículos) se originan de una manera similar, a partir de un primordio indiferenciado, que se observa en sus inicios como un engrosamiento del área ventral craneal del mesonefros.

Desde el punto de vista embriológico, la gónada indiferenciada se forma por dos tipos de células: las células somáticas y las células germinales primordiales.

En lo referente al origen de las células somáticas, sobre todo en mamíferos, existe aun controversia. Algunos autores como Zamboni, et al., trabajando con oveja, Upadhyay, et al. con conejo y Wartenberg examinando embriones humanos y de conejo (en Merchant-Larios, 1984), concluyen que la mayoría de las células somáticas se derivan del mesonefros. Byskov, A.G. (1986) comparte esta posición, pero considera también que las células del epitelio celómico pueden contribuir, aunque en menor grado, a la formación de la gónada. Por otra parte, Merchant-Larios (1984), sostiene que el "blastema gonadal" se forma por la condensación del mesénquima y por células del epitelio celómico.

Las células germinales primordiales (CGP), en el desarrollo temprano de muchos mamíferos, han sido identificadas en sitios extragonadales, como la porción caudal de la línea primitiva, el mesodermo del alantoides y el endodermo del saco vitelino, desde donde inician su recorrido hasta que se incorporan al primordio gonadal. Este

proceso migratorio se realiza por una combinación de movimientos ameboideos y transporte pasivo, favorecido por los movimientos morfogénicos de los tejidos embrionarios.

Una vez que las CGP han alcanzado el brote gonadal, entran en una etapa de intensa proliferación, que coincide cronológicamente con la proliferación de las células mesenquimatosas y del epitelio celómico, originándose así el llamado "blastema gonadal", que se sitúa en la región ventral del mesonefros.

El blastema gonadal tiende a organizarse en dos tipos de tejidos: 1) el tejido que contiene las CGP, rodeadas por células somáticas precursoras de las células de Sertoli o de la Granulosa y 2) el tejido estromático que dará origen al tejido conectivo, a los vasos sanguíneos y al tejido intersticial esteroidogénico, el cual estará representado por las células de Leydig o por las células de la Teca Interna y la Glándula Intersticial (Kofman-Alfaro, S., 1982; Merchant-Larios, H., 1984).

#### Diferenciación sexual de las gónadas.

En el caso de que se forme un testículo, el proceso de diferenciación principia en etapas muy tempranas del desarrollo, cuando el tejido epitelial interno, que contiene a las CGP se separa del epitelio celómico y se organiza en forma de cordones en la región medular de la gónada.

Al mismo tiempo, se inicia una "invasión" de tejido mesenquimatoso y gran cantidad de vasos sanguíneos,

provenientes de la región del mesonefros, entre los cordones y las láminas epiteliales. Esto hace, primero, que la gónada crezca mas rápido como un todo y segundo, acentúa la separación entre el epitelio medular y el epitelio celómico, al formarse la túnica albugínea.

Además, las primeras conexiones establecidas entre la gónada y los túbulos mesonefricos se ven fortalecidas eventualmente para formar la rete testis.

En lo que se refiere a la diferenciación ovárica, la separación del epitelio interno con respecto del epitelio celómico, se inicia mas tardíamente que en el testículo y el crecimiento de la gónada en general, se lleva a cabo con más lentitud.

Por otra parte, en el ovario, a diferencia del testículo, el volúmen es incrementado por la proliferación de las CGP y del epitelio celómico, más que por la invasión de tejido conectivo y vasos sanguíneos.

Más tarde, de manera análoga al testículo, el tejido epitelial se organiza en forma de cordones, pero estos mantienen su continuidad con el epitelio superficial. Además, las células germinales entran rápidamente en la profase de la primera división meiótica.

La siguiente etapa en la morfogénesis ovárica es la formación de folículos, que se inicia con la "fragmentación" de los cordones epiteliales, de manera que cada ovocito va quedando rodeado por una capa de células epiteliales, sostenidas por una lámina basal, para originar los folículos



primarios. La fase final de la foliculogénesis tiene lugar al formarse las tecas en torno a la lámina basal (Merchant-Larios, H. 1978).

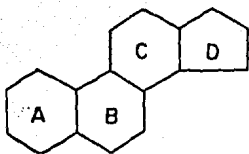
Hasta ahora se han descrito los cambios morfológicos más sobresalientes en la diferenciación gonadal, sin embargo, estos cambios de alguna manera están relacionados con la adquisición de capacidades esteroideogénicas propias de las gónadas y que juegan una papel esencial en la diferenciación y maduración de las células sexuales, el desarrollo del aparato reproductor y el establecimiento de los caracteres sexuales secundarios.

#### **HORMONAS OVARICAS.**

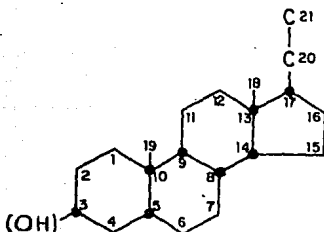
##### **Nomenclatura y Química de los Esteroides.**

La estructura común de todas las hormonas esteroideas es la del ciclopentanoperhidrofenantreno, que tiene 17 carbonos, formando 4 anillos que se designan de la A a la D (fig. 1). Pueden agregarse carbonos adicionales en las posiciones 10 y 13 o como una cadena lateral unida al carbono 17 (C17).

Tanto las hormonas esteroideas, como sus precursores y metabolitos difieren en el número y tipo de grupos sustituibles, en el número y localización de las dobles ligaduras y en la configuración estereoquímica. Existe una nomenclatura precisa para designar estas fórmulas químicas. Los carbonos asimétricos (sombreados en la molécula de 21 carbonos en la fig. 1) permiten el estereoisomerismo. Los



**Núcleo del  
ciclopentano  
perhidrofenantreno**



**Numeración de los átomos de  
carbono. Los carbonos  
asimétricos están sombreados**

**Figura 1:** Características estructurales de las hormonas esteroideas. La estructura común a todas las hormonas esteroideas es la del ciclopentanoperhidrofenantreno, constituido por 17 carbonos, que forman 4 anillos designados de la A a la D. Los carbonos asimétricos (sombreados en la molécula de 21 carbonos permiten el estereoisomerismo. (Tomada de: Granner, D.K., 1986).

grupos metilo angulares (C19 y C18) en las posiciones 10 y 13, se proyectan hacia el frente del sistema de anillos y se utilizan como punto de referencia.

Cuando los sustituyentes están por encima del plano, se dice que están orientados en beta ( $\beta$ ) y se indican con un trazo continuo. Por el contrario, si los sustituyentes se proyectan por debajo del plano, se denominan orientados en alfa ( $\alpha$ ) y se representan con un trazo discontinuo o líneas punteadas (fig. 2a).

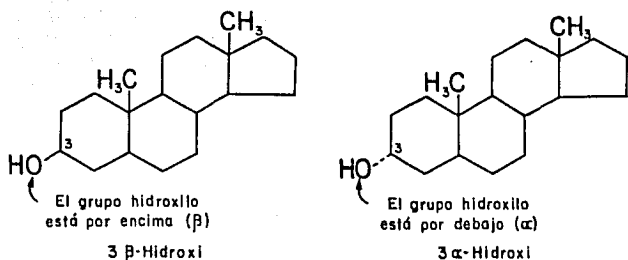
El átomo de hidrógeno unido al C5 puede estar orientado en  $\alpha$  o  $\beta$ . En el primer caso, los anillos se fusionan en una conformación trans, mientras que una orientación beta origina una conformación cis. En todas las hormonas esteroideas naturales que contienen un hidrógeno en el C5, este se orienta en posición  $\alpha$ . (Fig. 2b).

La posición de los dobles enlaces se designa mediante el número del carbono que los antecede (ej.  $\Delta^5$  y  $\Delta^4$ ).

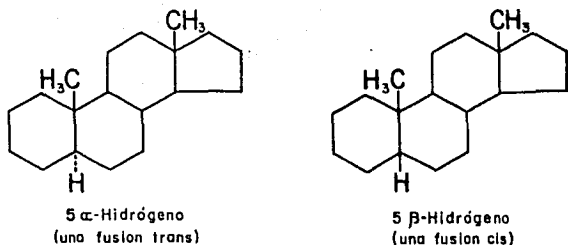
Las hormonas esteroideas son nombradas de acuerdo al contenido de metilos angulares: a) estrano, 18 carbonos, b) androstano, 19 carbonos y c) con dos grupos angulares y una cadena lateral de dos carbonos unida al C17 pregnano, 21 carbonos. (Stryer, L., 1981; Graner, D.K., 1986). (Fig. 3).

### Biosíntesis de los Esteroides Ováricos.

El ovario es capaz de sintetizar gran número de esteroides, aunque las hormonas secretadas son principalmente estrógenos y progesterona.



(a)

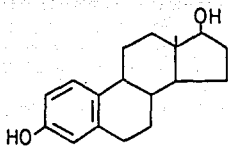


(b)

Figura 2. Estereoisomería de los carbonos 3 y 5 en el ciclopentanoperhidro fenantreno.

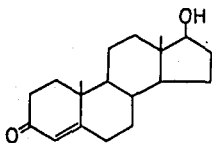
a) Cuando el sustituyente, en este caso el grupo hidroxilo, se encuentra por encima del plano, se denomina orientado en  $\beta$  y se indica con un trazo continuo. Si por el contrario, se encuentra por debajo del plano, se dice que está orientado en  $\alpha$  y se expresa con un trazo discontinuo.

b) Cuando el sustituyente (hidrógeno en posición 5), se encuentra orientado en  $\alpha$ , los anillos A y B se fusionan en una conformación *trans*, mientras que si está orientado en  $\beta$  origina una conformación *cis*. (Tomada de: Granner, D.K., 1986).



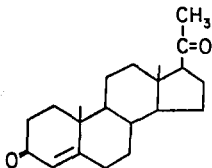
17β-Estradiol

Grupo estrano (C<sub>18</sub>)



Testosterona

Grupo androstano (C<sub>19</sub>)



Progesterona

Grupo pregnano (C<sub>21</sub>)

Figura 3. Nomenclatura de las hormonas esteroideas. Estas son nombradas por el contenido de metilos angulares. Con un metilo, estrano (18 carbonos); con dos, androstano (19 carbonos) y, con dos metilos angulares y una cadena lateral de dos carbonos unida al carbono 17, Pregnano (21 carbonos). (Tomada de: Granner, D.K., 1986).

La biosíntesis de esteroides en el ovario, se inicia a partir de colesterol proveniente de la sangre o sintetizado directamente del acetato vía mevalonato.

Las hormonas esteroideas tienen como máximo 21 carbonos, mientras que el colesterol tiene 27, por lo que la primera etapa en la síntesis de estas hormonas es la eliminación de la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona. Esto ocurre por una hidroxilación primero en el C20 y otra después en el C22, con la consecuente ruptura del enlace entre el C20 y el C22 por acción de la colesterol desmolasa. Las tres reacciones utilizan NADPH y  $O_2$ , siendo este último activado por el complejo enzimático citocromo P-450 (P-450<sub>ccc</sub>). (Fig. 4).

Una vez transformado el colesterol en pregnenolona (P5), la biosíntesis ovárica puede proseguir por dos vías: la vía de los  $\Delta^5$ , a partir directamente de pregnenolona o la vía de los  $\Delta^4$ , a partir de progesterona (P4). La última se forma por deshidrogenación del grupo hidroxilo en la posición 3 $\beta$  de la P5 que es seguida por un corrimiento del doble enlace hacia el carbono 4. Esta reacción es mediada por la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y la  $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -isomerasa ( $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -3 $\beta$ -OHS) cuyas actividades tienen una asociación funcional muy estrecha.

Enseguida, tanto la pregnenolona como la progesterona son hidroxiladas en el C17 por mediación de la 17 $\alpha$ -hidroxilasa y después se escinde la cadena lateral (C20 y C21), para producir los andrógenos (C19)

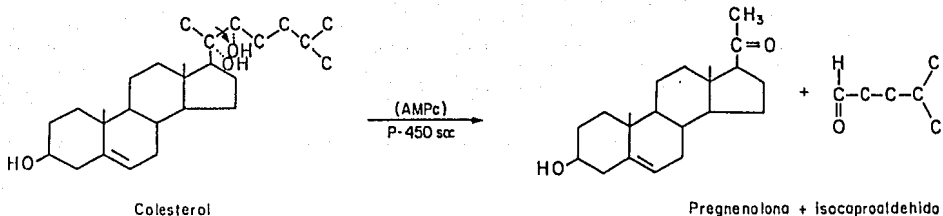


Figura 4. Separación de la cadena lateral del colesterol. El primer paso en la vía esteroidogénica es la ruptura de la cadena lateral del colesterol (27 carbonos), eliminando un fragmento de 6 carbonos o isocaproaldehído, para formar pregnenolona (21 carbonos). Esto se efectúa por una serie de hidroxilaciones en el C20 y el C22, con la subsecuente escisión del enlace entre estos dos carbonos por acción de la colesterol desmolasa. Dichas reacciones requieren NADPH y O<sub>2</sub>, el cual es activado por el citocromo P-450. (Tomada de: Granner, D.K., 1986).

dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona ( $\Delta^4$ ), respectivamente. Cuando se sigue la vía de los  $\Delta^5$  o de la DHEA, esta se puede transformar en androstenediona o reducir para formar androstenediol, que a su vez se convertirá en testosterona (T). Si se sigue la vía de los  $\Delta^4$ , la androstenediona se transformará directamente en testosterona por la acción de la enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ -OHD). (Fig. 5).

La última etapa en la esteroidogénesis ovárica, es la síntesis de estrógenos (estrona y estradiol), a partir de andrógenos (androstenediona y testosterona), por la pérdida del grupo metilo C19 y la formación de un anillo A aromático. Todo el proceso comprende tres hidroxilaciones, cada una de las cuales requiere  $O_2$  y NADPH y se lleva a cabo por mediación del complejo aromatasa, que se cree incluye también una oxidasa P-450 de función mixta. Si el sustrato para el sistema enzimático aromatasa es la androstenediona, se formará estrona, mientras que el estradiol resultará de la aromatización de la testosterona (fig. 6).

Todo este proceso, desde la formación de pregnenolona hasta la síntesis de estrógenos se lleva a cabo fundamentalmente en las mitocondrias y en el retículo endoplásmico liso (REL). Es así como el colesterol libre es transportado al interior de las mitocondrias en donde se efectúa la separación de la cadena lateral del colesterol con la consecuente formación de pregnenolona, la cual pasa al REL en donde es transformada en progesterona y sus



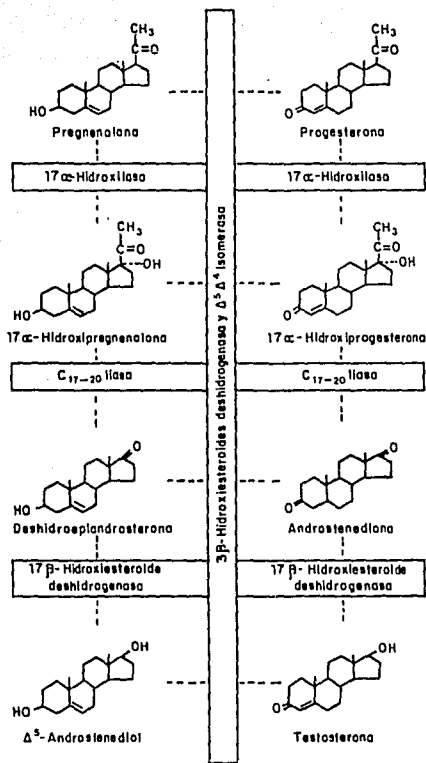


Figura 5. Intermediarios de la vía de los  $\Delta^4$  y de los  $\Delta^5$  en la síntesis de las hormonas gonadales. La vía de la izquierda se designa como vía de los  $\Delta^5$  o de la dehidroepiandrosterona y la vía de la derecha se denomina vía de los  $\Delta^4$  o de la progesterona. (Tomada de: Granner, D.K., 1986)

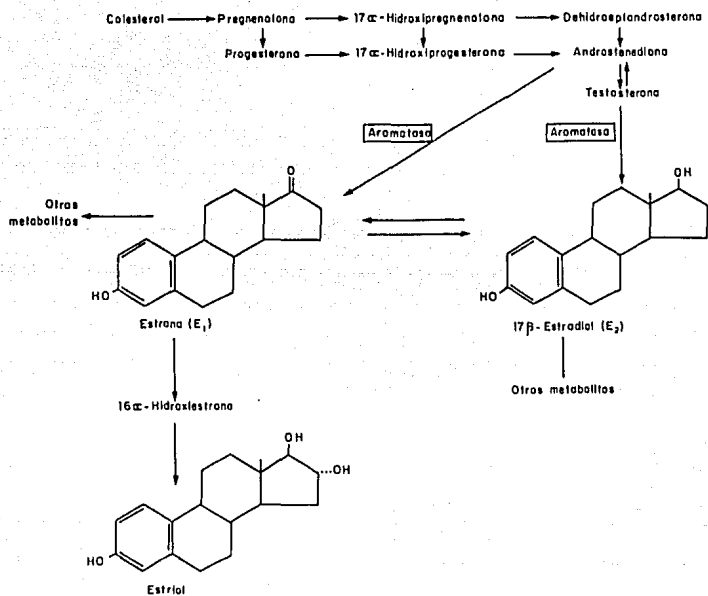


Figura 6. Síntesis de estrógenos. Es la última etapa en la esteroidogénesis ovárica y se realiza a partir de andrógenos (Androstenediona y testosterona), por la pérdida del metilo 19 y la formación de un anillo aromático. Este proceso es mediado por el complejo enzimático aromatasa. (Tomada de: Granner, D.K., 1986).

metabolitos. (Brodie, A.M.H., 1983; Granner, D.K., 1986).  
(Fig. 7).

#### TIPOS CELULARES INVOLUCRADOS EN LA ESTEROIDOGENESIS OVARICA. TEORIA BICELULAR.

Hasta ahora se ha analizado como se lleva a cabo la síntesis de esteroides ováricos y los organelos de las células esteroidogénicas involucrados en estos procesos bioquímicos.

Sin embargo, es fundamental para tener una comprensión más integral de la función ovárica saber que relación guardan los distintos componentes morfológicos de la gónada con la producción hormonal y como se va dando esta relación a lo largo del ciclo ovárico.

Es así como el interés por estudiar cuáles son las células ováricas que intervienen en la síntesis esteroidea surge desde hace ya varios años. Por ejemplo, en 1959, Falck, B. realizó una serie de experimentos aislando células de la granulosa, cuerpo lúteo, intersticiales y teca interna, las cuales transplantó individualmente o en combinación unas con otras, en la cámara anterior del ojo de ratas ovariectomizadas. En un sitio adyacente a estos transplantes, colocó otros de epitelio vaginal, para que sirvieran como indicadores de la secreción de estrógenos de las células ováricas. En estos experimentos no se detectó producción de estrógenos por los distintos tipos celulares cuando se transplantaron aisladamente, en cambio sí se

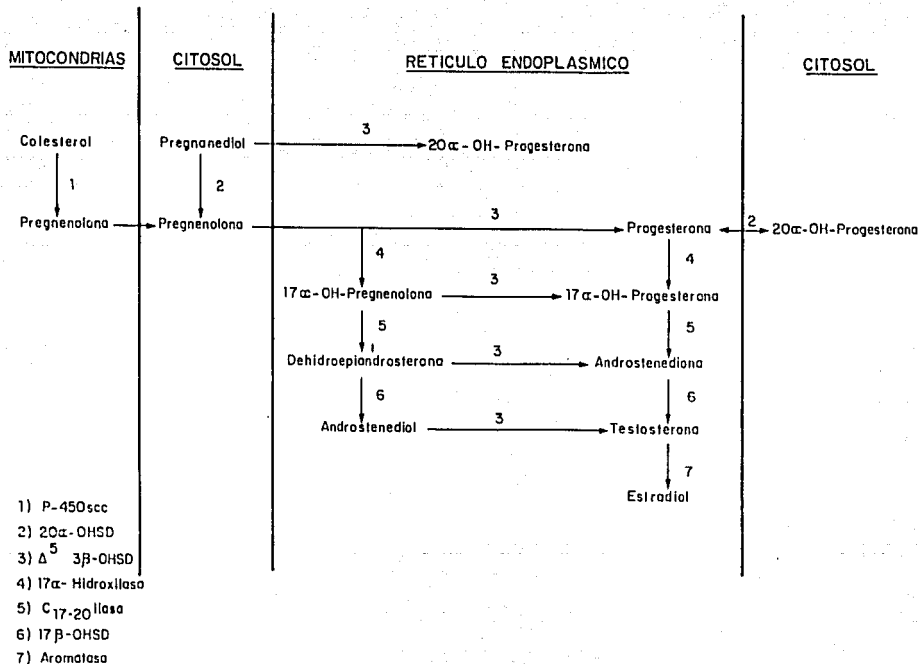


Figura 7. Localización subcelular de la síntesis de los esteroides gonadales.  
(Tomada de: Brodie, A.M.H., 1983).

observó secreción de estas hormonas al efectuar transplantes de diferentes tipos celulares combinados, por ejemplo, células de la granulosa con células lúteas e intersticiales con células de la teca interna. En base a esto Falck concluyó que la producción de estrógenos en el ovario, depende de la acción conjunta de dos sistemas celulares.

En 1962 Short, R.V., al cuantificar los esteroides presentes en el líquido folicular y el cuerpo lúteo del ovario de la yegua, planteó una doble teoría celular, al concluir que las células de la teca interna son responsables de la producción de estrógenos, mientras que las células de la granulosa luteinizadas elaboran principalmente progesterona.

Posteriormente en 1966, Ryan, K.J. y Petro, Z., realizaron experimentos "in vitro", cultivando por separado células de la teca y de la granulosa de folículos ováricos humanos, tanto con pregnenolona-7- $^3\text{H}$  como con progesterona 4- $^{14}\text{C}$ , encontrando como principales metabolitos: progesterona, 17-hidroxiprogesterona y estrona en los cultivos de la granulosa y, progesterona, 17-hidroxiprogesterona, androstenediona y estradiol en los cultivos de las células tecales. También observaron que la transformación de pregnenolona a progesterona era mucho mayor (60%) en las células de la granulosa que en las células de la teca (2.5%). Y al calcular la relación  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  para cada metabolito, los resultados sugirieron que la vía

La actividad esteroideogénica preferente en las células tecales era la de  $17\beta$ -OHSD.

Por otra parte Bjersing, L. (1967) al trabajar con células de la granulosa, aisladas de folículos inmaduros de preovulacion, observó que estas células solo tenían la capacidad de transformar pregnenolona en progesterona y  $20\alpha$ -hidroxiprogesterona. Pero si eran incubadas en presencia de androstenediona y testosterona, había producción de estrógenos, lo cual indicaba que contaban con las enzimas necesarias para aromatizar andrógenos a estrógenos.

En este trabajo, el autor también sugiere que en el folículo ovárico, andrógenos precursores como la androstenediona, son elaborados por las células de la teca interna y transferidos, a través de la membrana basal del folículo, a las células de la granulosa para que estas realicen la transformación a testosterona; mientras que la aromatización a estrógenos (principalmente  $17\beta$ -estradiol) puede ser efectuada por ambos tipos celulares.

Sin embargo en 1976, Erickson, F.E. y Ryan, J.K., al realizar estudios para medir la secreción de testosterona por la teca y la granulosa de folículos ováricos de coneja adulta en estro, encontraron que al cultivarlas por separado con LH/FSH o Bu2cAMP, las células de la teca producían respectivamente 60 y 10 veces más testosterona que las de la granulosa, sugiriendo que la teca es la principal fuente de testosterona en el folículo preovulatorio de coneja. De modo similar, Fortune, J.E. et al (1977) al incubar aisladamente

células de la teca y de la granulosa de folículos de rata en proestro, en presencia o ausencia de LH y/o FSH, observaron que las primeras secretan andrógenos en ausencia de gonadotropina exógena y que la producción de estos aumenta de 9 a 17 veces mas al administrar LH; mientras que en las células de la granulosa no se detectó formación de andrógenos en ningún caso. Esto los llevó a proponer que "in vivo" la teca, bajo la influencia de LH, podría ser la fuente principal de andrógenos aromatizables para la síntesis de estradiol en el folículo.

Otros autores como Dorrington, H.J. et al (1975), detectaron en células de la granulosa de folículos de ratas inmaduras e hipofisectomizadas, producción de 17 $\beta$ -Estradiol, al incubar en presencia de testosterona y FSH, planteando que probablemente las células de la teca, bajo la influencia de LH secreten andrógenos, los cuales son transportados a las células de la granulosa para su aromatización bajo la influencia de FSH.

También resultan interesantes los experimentos diseñados por Makris, A. y Ryan, K.J. (1975), con el objeto de estudiar las capacidades esteroidogénicas del ovario de hámster en proestro, para lo cual, cultivaron células de la teca y de la granulosa aisladamente o en conjunto, midiendo por radioinmunoanálisis la producción de progesterona, androstenediona, testosterona, estrona y estradiol en cada caso. En base a los resultados obtenidos, los autores reportan que "in vitro", tanto las células de la teca como

las de la granulosa, secretan grandes cantidades de progesterona, mientras que la acumulación de andrógenos es mayor en el medio de cultivo correspondiente a las células tecales. Además, observan un efecto sinérgico entre las células de la granulosa y de la teca, al cultivarlas en conjunto, que tiene como consecuencia la máxima síntesis de estrógenos.

Posteriormente en 1984, Takahashi, H. et al., trabajaron con ovarios de ratas inmaduras, tratadas con gonadotropina sérica de yeguas preñadas (PMSG), con el objeto de observar la producción endógena de progesterona, andrógenos y estrógenos en células de la teca y de la granulosa incubadas por separado y en conjunto, así como la pared folicular intacta. De esta manera demostraron que en esta última había una mayor acumulación de estrógenos y andrógenos en comparación con las demás, infiriendo que esto puede deberse a la existencia de efectos dependientes de la estructura, capaces de aumentar la acumulación de andrógenos en la pared folicular, lo cual aportaría más sustratos para la aromatización a estrógenos.

Experimentos más recientes, realizados por Liu, Y.X y Hsueh, A.J.W. (1986) con folículos ováricos de ratas inmaduras sensibilizadas con PMSG, los llevaron a concluir que las interacciones sinérgicas entre las células de la granulosa y la teca son importantes para lograr el máximo efecto biosintético de estrógenos en el ovario y sugirieron además que la progesterona producida por las células de la



granulosa es utilizada por la teca para elaborar andrógenos que serán después aromatizados a estrógenos por las células de la granulosa.

Es así como múltiples investigadores han hecho importantes aportaciones en torno a la teoría bicelular para la síntesis de estrógenos, que ahora es ampliamente aceptada y que plantea una acción conjunta entre las dos poblaciones celulares del folículo ovárico y las hormonas hipofisarias, para que se lleve a cabo la síntesis de estrógenos.

#### **Esteroidogénesis fetal.**

La función endócrina del testículo fetal ha sido ampliamente estudiada, debido al papel preponderante que esta juega en la determinación de las características fenotípicas masculinas durante el desarrollo embrionario.

De este modo ha quedado establecido que el testículo fetal elabora sustancias que son fundamentales en el desarrollo del fenotipo masculino: 1) la hormona anti-müllerinana (AMH), que es producida por las células de Sertoli, no se ha podido purificar totalmente y es responsable de la regresión de los conductos de Müller (Josso, N. et al., 1977) y 2) la testosterona, que induce la virilización de los conductos de Wolff y sirve como precursor para la formación de dihidrotestosterona, el esteroide intracelular responsable de la masculinización del

seno urogenital y los genitales externos (Goldstein, J.L. et al., 1975).

En el caso de los mamíferos, se ha detectado producción de testosterona en el momento de la diferenciación sexual en testículos fetales de diversas especies, entre los que se incluyen: humano (Bloch, E., 1964) (Reyes, F.I. et al., 1973), rata (Noumura, T. et al., 1966), armadillo, perro (Bloch, E., 1967) conejillo de indias (Bloch, E., 1967) (Sholl, S. et al., 1978) y cerdos (Raeside, J.I., 1985).

Son de particular interes los estudios de Jost (1953), el cual, al trabajar con fetos castrados del sexo femenino y masculino, observó que los primeros presentaban un desarrollo normal, mientras que en los últimos había una regresión de los conductos de Wolff, con la consecuente persistencia de los conductos de Müller y la aparición de estructuras genitales femeninas. En base a los resultados obtenidos, Jost concluye que la función endócrina del ovario fetal no es esencial para el establecimiento de las características fenotípicas femeninas.

Por otra parte, al trabajar con ovarios fetales humanos, Bloch, E. (1964) reporta que estos son relativamente inactivos en lo que se refiere al metabolismo de la progesterona y Reyes, F.I. et al. (1973) prácticamente no detectaron estradiol o en los casos en que lo hicieron, fue solo en cantidades mínimas.

Sin embargo, estudios realizados por George, F.W. y Wilson, J.D. (1978), demostraron que las gónadas femeninas

de fetos humanos de 3.1 a 20 cm de longitud coronilla-rabadilla (C-R), eran capaces de sintetizar  $17\beta$ -Estradiol al ser incubadas con testosterona [ $1,2,6,7-^3\text{H}$ ] o androstenediona [ $1,2,6,7-^3\text{H}$ ]. Estos resultados los llevaron a concluir que, en este caso, la capacidad del ovario fetal para sintetizar estrógenos se desarrolla antes de la diferenciación histológica del tejido gonadal y, más o menos, al mismo tiempo en que el testículo fetal empieza a producir testosterona.

Más adelante, Sholl, S.A. et al (1978) observaron síntesis de androstenediona, al incubar ovarios fetales de conejillos de indias en presencia de acetato- $^{14}\text{C}$ , así como transformación de androstenediona [ $1,2-^3\text{H}$ ] y [ $1-^3\text{H}$ ] en agua tritiada, estrona- $^3\text{H}$  y estradiol- $^3\text{H}$ , en donde estos dos últimos metabolitos (estrógenos), representaban del 16% al 23% de la radioactividad total.

Otros autores como Weninger, J.P. et al (1984) al trabajar con ovarios de embriones de ratas de 19 a 20 días de gestación, utilizando como precursores testosterona- $^3\text{H}$  y progesterona- $^3\text{H}$ , detectaron cantidades medibles de estrona. Y Picon, R. et al. (1985) al realizar experimentos "in vitro" con gónadas femeninas de embriones y neonatos de rata, para medir la conversión de andrógenos a estrógenos, demostraron que ésta se efectúa en ambos casos, concluyendo además que la actividad de la aromatasa permite diferenciar a las gónadas femeninas de las masculinas aún en etapas

anteriores al inicio de la producción de testosterona en los testículos fetales de esta especie de mamíferos.

La esteroidogénesis ovárica fetal también ha sido extensamente estudiada en conejo por diversos investigadores entre los cuales destacan Milewich, L. et al. (1977), que detectan síntesis de estradiol en ovarios de embriones de conejo de 18 días de gestación, alcanzando rápidamente un nivel de 6 pg/h/mg de proteína hacia el día 19. En función de estos datos infieren que el ovario fetal de conejo tiene la capacidad enzimática para transformar esteroides C19 a C18 y que esta es adquirida por las gónadas fetales femeninas al mismo tiempo que el testículo fetal de conejo puede sintetizar testosterona a partir de pregnenolona. George, F. et al (1978), al realizar estudios para comparar la esteroidogénesis ovárica y testicular en embriones de conejo en el momento de la diferenciación sexual, obtienen resultados similares.

George, F. y Wilson, J.D. (1980) al llevar a cabo experimentos "in vivo" e "in vitro" para detectar la síntesis y secreción de estradiol en ovario fetal de conejo y para determinar la actividad de la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa  $\Delta^4 \rightarrow \Delta^3$  isomerasa, concluyen que la diferenciación endócrina del ovario fetal de conejo, así como del testículo, ocurre al mismo tiempo en las gónadas en cultivo, que "in vivo", por lo que sugieren que dicha diferenciación, en este caso, es inherente a las gónadas y no es controlada por factores externos.

Shemesh, M. et al (1978), trabajando con ovarios fetales de bovino de 32 a 35 días (1.8 a 2.5 cm de long. C-R) y de 36 a 85 días de gestación (2.6 a 12.4 cm de long. C-R), observaron producción de progesterona y prostaglandinas E y F en todos los casos estudiados y de  $17\beta$ -estradiol (1.6 a 2.2 ng/ovario/24 hs) solamente en ovarios de fetos de 3.3 a 8 cm de long. C-R. Además, al adicionar a los cultivos LH, encontraron que la secreción de estradiol aumentaba únicamente en ovarios de fetos de 3.3 a 4.1 cm de long. C-R. Estos resultados comparados con los obtenidos al trabajar con testículos fetales en las mismas condiciones, les permitieron demostrar que la producción de testosterona en testículos y de  $17\beta$ -estradiol en ovarios fetales de bovino, se inicia más o menos al mismo tiempo en que estas gónadas empiezan a diferenciarse morfológicamente (42-48 días de gestación, 3.3 a 4.1 cm long. C-R).

Cabe hacer notar que en la mayoría de los trabajos mencionados anteriormente la diferenciación funcional de las gónadas fetales femeninas se inicia más o menos al mismo tiempo o en ocasiones hasta un poco antes que la diferenciación morfológica. Esta observación ha llevado a varios investigadores a la conclusión de que, si bien es cierto que la esteroidogénesis ovárica en etapas fetales no es indispensable para el establecimiento del fenotipo femenino, pudiera jugar un papel importante en la diferenciación sexual de la gónadas.

### Objetivo.

El hecho de saber que en el ovario adulto hay poblaciones con capacidades esteroidogénicas diversas, como lo expresa la teoría bicelular, nos llevó a plantear la posibilidad de que esta diferenciación se iniciara desde etapas fetales.

Por otra parte, como la síntesis de  $17\beta$ -estradiol se ha observado en el momento en que las gónadas fetales empiezan a mostrar una diferenciación morfológica, se consideró interesante como punto de partida, caracterizar la esteroidogénesis en la corteza y en la médula ováricas, ya que son componentes que de una manera natural, juegan un papel importante en la diferenciación sexual de las gónadas.

En base a lo anterior, el objetivo del presente trabajo es: detectar si existen en el ovario fetal de bovino, poblaciones celulares con distintas capacidades esteroidogénicas en el momento de la diferenciación gonadal. Para esto, se estudiaron en corteza y médula por separado, la actividad de la aromatasa y de la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa  $\Delta^4\rightarrow^3$  isomerasa y su posible localización, observando si ambos parámetros variaban a lo largo de la diferenciación de las gónadas sexuales femeninas de bovino.

## MATERIAL Y METODOS.

### MATERIAL

#### Reactivos.

Se utilizó como medio de cultivo el Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que, al igual que la tripsina se obtuvo de Grand Island Biological Co. (Grand Island N.Y.). El inhibidor de tripsina, la albúmina sérica bovina y los estándares de testosterona, 4-androsten-3,17-diona, 5 $\alpha$ -androsterona, 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, dehidroepiandrosterona, estradiol, estrona, pregnenolona, 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona, progesterona, 17 $\alpha$ -hidroxiprogestero-  
na y 20 $\alpha$ -hidroxiprogestero-  
na, fueron obtenidos en Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo.).

Para la cromatografía en placa fina, se emplearon cromatofolios Al de Silica gel G-60 con indicador fluorescente F-254 de 20 X 20 cm. (Merck, México) y para la cromatografía en columna, Sephadex LH-20, adquirido en Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden).

La testosterona [1,2,6,7- $^3$ H] (93.9 Ci/mmol) y la pregnenolona [7- $^3$ H] (17.7 Ci/mmol), fueron obtenidas de New England Nuclear (Boston, Ma.) y se purificaron en placas preparativas de sílica gel G-60 sin indicador fluorescente de 20 X 20 cm (Merck, Mexico).

#### Material biológico.

Se trabajó con ovarios de fetos de bovino tipo cebú (Vos indicus), que fueron obtenidos en el rastro de Ferrería de la Dirección General de Abasto del D. F.

## **MÉTODOS.**

### **Obtención de Gónadas.**

En diferentes fechas, se colectaron ovarios de fetos de bovino de 4 a 10 cm de longitud coronilla-rabadilla (C-R), que correspondían a una edad aproximada de 47 a 75 días de gestación.

Los fetos se obtuvieron inmediatamente después del sacrificio y se seleccionaron las hembras, determinando el sexo por sus características morfológicas externas. Las gónadas se disecaron ahí mismo, sumergiéndolas inmediatamente en medio de cultivo Dulbecco-albúmina al 1% y se mantuvieron de 2 a 4 horas a temperatura ambiente, hasta iniciar la disgregación celular.

### **Disgregación de las poblaciones celulares.**

Se separó corteza de médula en cada par de ovarios utilizando agujas de disección, con el objeto de disgregar las células. Cada muestra de tejido se incubó por separado en una solución de tripsina al 0.25% libre de Ca y Mg, en un agitador metabólico Dubnoff a 38°C durante 10 minutos. Posteriormente, cada una de estas poblaciones se pasó a tubos de centrífuga, filtrando previamente con una tela de nylon para quitar la parte fibrosa. Se agregó inhibidor de tripsina al 1% disuelto en Dulbecco y se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 120 rpm, repitiendo el procedimiento dos veces.



Finalmente se resuspendió el botón en Dulbecco-albúmina al 1% y se tomó una alícuota de 10  $\mu$ l para calcular el número de células por ml de medio, utilizando para esto una cámara cuenta glóbulos. Se agregó también azul de tripano con el objeto de calcular la mortalidad celular, que fue de un 5-10 % aproximadamente.

### Síntesis de Estrógenos (Actividad de la Aromatasa).

Se tomaron 100  $\mu$ l de la suspensión celular de corteza y médula respectivamente y se incubaron por separado con 900  $\mu$ l de medio (Dulbecco-albúmina) y 10  $\mu$ l de T [1,2,6,7-<sup>3</sup>H] (sustrato bajo, 190-250 fmol, sustrato medio, 300-317 fmol y sustrato alto, 400 fmol) cada una, durante una hora a 37 °C en baño con agitación. También se preparó un blanco con 1000  $\mu$ l de medio de incubación y 10  $\mu$ l de testosterona tritiada.

Se dió fin a la incubación con 10 ml de éter etílico en frío, y se realizaron 3 extracciones con 30 volúmenes del mismo en total, evaporándose a sequedad. El extracto etéreo se resuspendió en 100  $\mu$ l de etanol, de los cuales se tomaron 40  $\mu$ l para proceder al aislamiento e identificación de los productos de biotransformación de la testosterona mediante cromatografía en placa fina.

Con cada alícuota de la muestra y por separado se aplicaron los siguientes estándares: Testosterona (T), Dehidroepiandrosterona (DHEA), Androstenediona ( $\Delta^4$ ), Androsterona (5 $\alpha$ -ona), Dihidrotestosterona (DHT), 17 $\beta$ -estradiol (E2) y Estrona (E1).

La cromatografía se desarrolló en un sistema de solventes de Diclorometano/Acetato de Etilo, 8:2 (v/v). La placa fué revelada primero con luz ultravioleta y posteriormente con ácido sulfúrico al 50 % (acuoso) únicamente en la zona ocupada por los estándares.

Después de identificar los esteroides separados, se cortó la placa y las fracciones obtenidas se sumergieron en 5 ml de líquido de centelleo, para contar la cantidad de radioactividad existente en cada una de ellas.

Por último, se calcularon los porcentajes de transformación de la testosterona hacia sus metabolitos.

#### **Identificación de los metabolitos de la Pregnenolona.**

El procedimiento utilizado para la obtención de las gónadas, la separación de corteza y médula y la disgregación de las células de cada una de ellas, fue idéntico al empleado en el ensayo con testosterona.

Una vez obtenidas las suspensiones celulares de corteza y médula, se tomaron 100 µl de cada una, incubándolas por separado con 900 µl de medio de cultivo, y 5 µl de Pregnenolona [7-<sup>3</sup>H] (61 000 cpm.), en baño con agitación a 38 °C, durante una hora, así como el blanco, que fué preparado con 1000 µl de medio de cultivo y 5 µl de pregnenolona tritiada.

Se concluyó la incubación con 10 ml de éter etílico en frío y se efectuaron 3 extracciones con 30 volúmenes del mismo en total, evaporándose a sequedad. La fase orgánica se resuspendió en 100 µl de etanol.

La pregnenolona y sus metabolitos se separaron primero, por cromatografía en columna y después, por cromatografía en placa fina.

Cromatografía en columna.- Se tomo una alícuota de 40  $\mu$ l de cada muestra y el blanco, agregándose los siguientes estándares, para que sirvieran de acarreadores: Pregnenolona (P5), Progesterona (P4), 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona (17 $\alpha$ -OH P5), 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (17 $\alpha$ -OH P4), 20 $\alpha$ -hidroxiproges-terona (20 $\alpha$ -OH P4), Androstenediona ( $\Delta^4$ ), Testosterona (T), Dehidroepiandrosterona (DHEA), 17 $\beta$ -Estradiol (E2) y Estrona (E1).

Los 40  $\mu$ l de las muestras problema con la mezcla de estándares, se corrieron en una columna de 7.5 cm de largo por 0.5 cm de diámetro, utilizando un sistema de solventes de Benceno/Metanol 9:1 y se colectaron 20 fracciones a intervalos de dos minutos cada una.

Cromatografía en placa fina.- Las fracciones obtenidas por el procedimiento anterior se resuspendieron en 5 o 6 gotas de Benceno/Metanol 9:1 y se aplicaron en su totalidad, así como, por separado, los estándares mencionados anteriormente.

La cromatografía se corrió en un sistema de solventes de Diclorometano/Acetato de Etilo 8:2, después de lo cual la placa se reveló, primero con luz ultravioleta y después con ácido sulfúrico al 50% (acuoso), solamente en la región en la que se aplicaron los estándares. Se procedió a cortar la placa, agregando 5 ml de líquido de centelleo a cada

fracción para contar la cantidad de radioactividad existente en cada una de ellas.

Por último, se calcularon los porcentajes de transformación de la Pregnenolona hacia sus metabolitos.

#### Histoquímica. Detección de la $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$ Isomerasa.

Las gónadas se obtuvieron del mismo modo que en los otros experimentos y se colocaron en cápsulas de polietileno que contenían hexano, las cuales fueron sumergidas en acetona y hielo seco, de manera que las muestras quedaran congeladas. Se almacenaron durante tres días a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para efectuar después cortes transversales de  $15\ \mu\text{m}$  de espesor con un crióstato American Optical, manteniendo la misma temperatura.

Los cortes se colectaron en portaobjetos tratados con gelatina, se dejaron secar unos minutos y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas en el siguiente medio: 20 ml de Buffer (Tris 0.1 M, pH 7.4), 10 mg de azul de tetrazolio, 20 mg de NAD y 2 mg de dehidroepiandrosterona disuelta previamente en dimetilformamida. Los controles se sometieron al mismo procedimiento en un medio carente de sustrato.

Después de la incubación, los cortes se lavaron en amortiguador de Tris, se fijaron en formol amortiguado al 10% y se montaron en glicerol, procediendo finalmente a su observación en un fotomicroscopio (Polyvar) para ser fotografiados.

## RESULTADOS.

Se utilizó como parámetro de la edad gestacional de los embriones empleados, la longitud de coronilla a rabadilla (long. C-R), expresada en centímetros, como lo muestra la figura 8.

### Síntesis de 17 $\beta$ -Estradiol (Actividad de Aromatasa).

Para poder comparar los resultados entre sí, se corrigieron los porcentajes de transformación en femtomoles de estradiol producidas por un millón de células en una hora (fmol E2/ 10<sup>6</sup> cels/ h) y se graficaron contra long. C-R, considerando por separado las gónadas que se habían cultivado con un sustrato inicial alto (400 fmol), medio (300-317 fmol) o bajo (190-250 fmol) respectivamente.

Se tomó como índice de la actividad de aromatasa la síntesis de 17 $\beta$ -estradiol a partir de testosterona [1,2,6,7, <sup>3</sup>H], ya que, bajo las condiciones utilizadas, la transformación de esta a otros metabolitos se efectuaba en cantidades despreciables, siendo el producto principal 17 $\beta$ -estradiol.

De acuerdo con los datos obtenidos, tanto corteza como médula son capaces de aromatizar testosterona a estradiol y no hay diferencias significativas entre las dos regiones, considerando los datos en conjunto, aunque en corteza la actividad de dicho complejo enzimático parece aumentar al adicionar más sustrato (fig. 9).

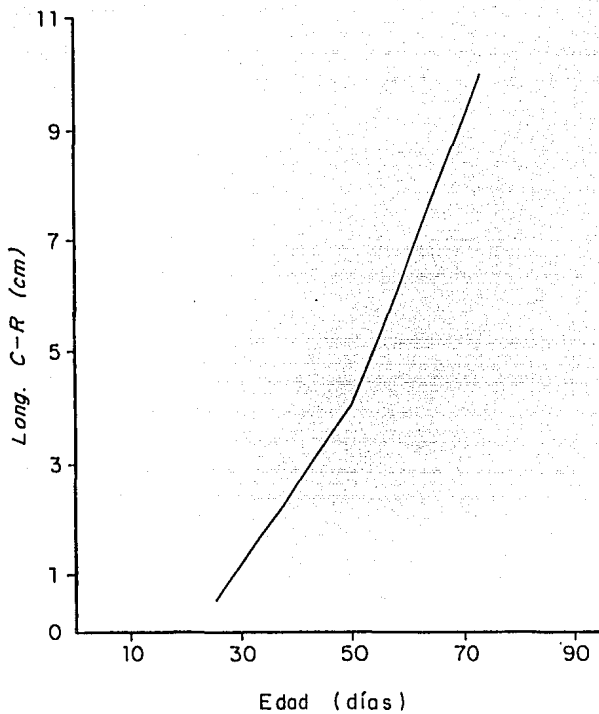


Figura 8. Correlación entre la edad gestacional de los embriones y la longitud coronilla-rabadilla.

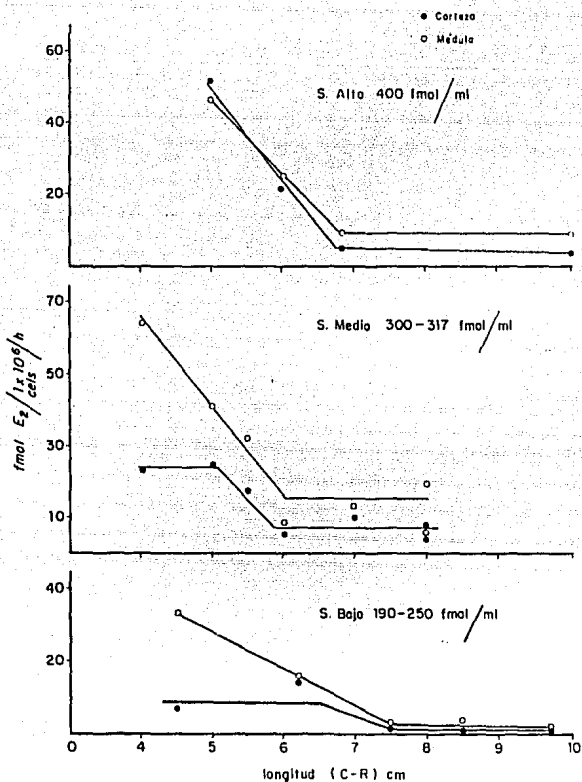


Figura 9. Síntesis de  $17\beta$ -estradiol en suspensiones celulares de corteza (●) y médula (○) de ovarios de fetos de bovino de distintas edades gestacionales. Se incubaron durante una hora en medio Dulbecco-albúmina con diferentes concentraciones de testosterona [ $1,2,6,7-^3\text{H}$ ] (sustrato alto, medio y bajo). Los resultados se expresan en fmol. de estradiol, por millón de células, por hora.

También podemos observar que hay una mayor producción de  $17\beta$ -estradiol (mayor actividad de aromatasa), tanto en corteza como en médula de ovarios de embriones de 4 a 5 cm. de long. C-R y que esta va decayendo en las dos regiones en ovarios de embriones de 6 a 7 cm de long. C-R en adelante (fig. 9).

#### Productos de biotransformación de la Pregnenolona [ $7\text{-}^3\text{H}$ ].

Cuando los ovarios se incubaron en presencia de pregnenolona [ $7\text{-}^3\text{H}$ ], los principales metabolitos detectados fueron los siguientes:

Andrógenos (C19): dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenediona ( $\Delta^4$ ) y testosterona (T).

Progestágenos (C21): progesterona (P4) ,  $20\alpha$ -hidroxiprogestero-  
na ( $20\alpha\text{OHP4}$ ),  $17\alpha$ -hidroxiprogestero-  
na ( $17\alpha\text{OHP4}$ ) y  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona ( $17\alpha\text{OHP5}$ ).

Estrógenos (C18): estrona (E1).

Los porcentajes de transformación hacia estos productos en los diversos casos estudiados se ilustran en la tabla 1.

La  $20\alpha\text{OHP4}$  y la  $17\alpha\text{OHP4}$  se consideraron en conjunto, debido a que no fue posible separarlas por los métodos cromatográficos utilizados, además de que las cantidades producidas eran mínimas.

En lo referente a los estrógenos, solamente se detectaron pequeñas cantidades de estrona.



TABLA I. TRANSFORMACION DE LA PREGMENOLONA 7-3H EN SUS DIFERENTES METABOLITOS.

ESTEROIDE	EMBRION 4 ca. C-R		EMBRION 6 ca. C-R		
	CORTEZA %	MEDULA %	CORTEZA %	MEDULA %	
P5 REMANENTE	52.90	53.70	24.30	58.25	
C-19	DHEA	10.45	8.30	24.70	15.10
	$\Delta^4$	3.22	1.90	5.70	5.30
	T	3.81	4.33	10.87	2.80
C-21	P4	6.20	13.30	4.65	10.10
	20 $\alpha$ DHP4	0.75	1.54	4.79	1.26
	17 $\alpha$ DHP4 *				
	17 $\alpha$ DHP5	n.d.	4.60	9.35	5.20
C-18	E1	0.23	0.03	0.91	1.10

\* Los valores representan los porcentajes de transformación.

† Los valores de 20 $\alpha$ DHP4 incluyen a los de 17 $\alpha$ DHP4.

Los porcentajes de recuperación de la radioactividad inicial para los ensayos con pregnenolona y testosterona fueron prácticamente del 100%.

Actividad de la enzima  $\Delta^{13-14}$  Isomerasa, 3 $\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $\Delta^{13-14}$ , 3 $\beta$ -OHSDH).

Para realizar esta parte del trabajo únicamente se obtuvieron ovarios de embriones de 4 y 6 cm de long. C-R.

En el bioensayo se utilizó como índice de la actividad de la enzima la relación entre los principales metabolitos de la pregnenolona resultantes de la vía de los  $\Delta^4$  (progesterona, androstenediona y testosterona) y los de la vía de los  $\Delta^3$  (dehidroepiandrosterona), con el objeto de observar como se comportaban la corteza y la médula de los ovarios empleados, en este aspecto.

TABLA 2. INDICE DE ACTIVIDAD DE LA ENZIMA  
 $\Delta^5-4 - 3\beta$ -OHSOH.

LONG. C-R (cm.)	(P4 + $\Delta^4$ / DHEA) CORTEZA	MEDULA
4	0.90	1.80
6	0.42	1.02

Como se muestra en la tabla 2, la actividad de la enzima  $\Delta^5-4$ ,  $3\beta$ -OHSOH se detectó tanto en corteza como en médula, siendo mayor en esta última tanto en los ovarios de embriones de 4 cm, como en los de 6 cm. Estos resultados se vieron confirmados con los obtenidos al efectuar la reacción histoquímica, ya que esta se localiza principalmente en la médula subcortical, como se observa en la figura 10.

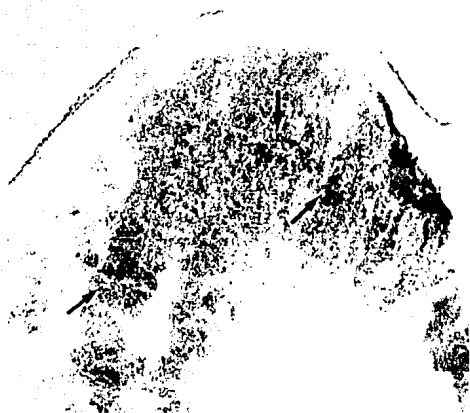


Figura 10. Reacción histoquímica de la  $\Delta^{5-4}$ , 3 $\beta$ -OHSOH, en un corte por congelación de ovario de feto de bovino de 6 cm (C-R). Se observa la precipitación de gránulos de formazán en el citoplasma de las células de la médula subcortical (†).

## DISCUSION Y CONCLUSIONES.

En principio decidimos estudiar la actividad de la aromatasa, debido a que este complejo enzimático es el responsable del metabolismo de los andrógenos a estrógenos, siendo el 17 $\beta$ -estradiol el producto final mas importante de la vía esteroidogénica en las gónadas femeninas. Por lo anterior, tomamos como índice de actividad de la aromatasa el porcentaje de transformación de testosterona tritiada a 17 $\beta$ -estradiol.

Debido a que la cantidad de estradiol producida por el ovario fetal es muy pequeña, decidimos utilizar el método de seguimiento isotópico, puesto que es sumamente sensible. Esto nos permitió detectar cantidades del orden de femtomoles en cada ensayo, a pesar de haber aplicado el sustrato en concentraciones muy bajas (190 a 400 fmol).

Otras metodologías alternativas serían el radioinmunoensayo (RIA) y la formación de agua tritiada; sin embargo no se consideraron, porque el nivel de sensibilidad en ambos es menor y en el caso del RIA, los anticuerpos requeridos para llevarlo a cabo podrían presentar reacción cruzada con otros esteroides. En lo referente a la formación de agua tritiada, hay otros inconvenientes como son el hecho de necesitar una gran cantidad de sustrato, en este caso testosterona, en la que además la mayor parte del tritio tendría que estar en posiciones 1 $\beta$  y 2 $\beta$ .

Con base en los resultados que obtuvimos en el presente trabajo, consideramos importante hacer notar que tanto en la

corteza como en la médula ováricas hay una mayor producción de  $17\beta$ -estradiol a partir de testosterona tritiada en ovarios de fetos de 4 a 5 cm de long. C-R, que después va decreciendo hasta que en ovarios de fetos de 6 a 7 cm de long C-R en adelante la transformación hacia este producto es mínima en ambas zonas.

Cabe comentar que Shemesh, en 1978, al trabajar con ovarios de fetos de la misma especie, observó un comportamiento similar en lo referente a la secreción de  $17\beta$ -estradiol, que se caracteriza por un incremento en la producción de dicho esteroide que alcanza su máximo nivel en ovarios de fetos de 4.2 a 8 cm de long. C-R, para que a partir de este momento decaiga hasta cantidades indetectables. Esto resulta interesante sobre todo si consideramos que nosotros estamos cuantificando actividad de aromatasas en corteza y médula ováricas por separado, mientras que Shemesh cultiva gónadas íntegras para medir secreción de  $17\beta$ -estradiol por radioinmunoensayo. Además, en ambos casos el aumento en la producción de estradiol coincide con las primeras etapas de la diferenciación morfológica de las gónadas.

Lo anterior nos lleva a considerar la posibilidad de que el inicio de la síntesis de  $17\beta$ -estradiol sea un requisito para que se desencadenen otros eventos de la diferenciación ovárica y que si bien es ampliamente aceptado que la función endócrina del ovario fetal no es esencial para el establecimiento del fenotipo femenino (Jost, A., 1953), sin

embargo, pudiera ejercer un efecto local dentro del ovario en desarrollo.

En este sentido, aunque la función del estradiol secretado por ovarios de embriones en etapas tempranas del desarrollo no es clara, se piensa que podría ser un elemento importante en la transformación de las células germinales en ovogonias y en la diferenciación de las células somáticas (Shemesh et al., 1978). O bien, como sugiere Byskov (1979), pudiera regular la producción de la sustancia inhibidora de la meiosis, inactivando o inhibiendo a esta última, para que se inicie la profase de la primera división meiótica.

Como mencionamos anteriormente, nosotros hemos considerado la transformación de testosterona en 17 $\beta$ -estradiol como índice de actividad de la aromatasa y, en este sentido, los resultados obtenidos nos llevan a concluir que tanto en la corteza como en la médula, se encuentran poblaciones celulares capaces de aromatizar andrógenos (testosterona) a estrógenos (estradiol) y que a nivel cuantitativo y considerando los datos en conjunto, una región no difiere significativamente de la otra en relación a la síntesis de estradiol. Sin embargo, cuando se aplica un sustrato inicial medio (300 a 317 fmol) o bajo (170-250 fmol), parece haber una mayor actividad enzimática en médula. Una posible explicación a este hecho podría ser que hubiera distintas cantidades de testosterona endógena en cada región, de manera que al agregar de 170 a 300 fmol de testosterona tritiada, la actividad específica de esta sea menor en corteza, tradu-

ciéndose así en una menor actividad enzimática detectable, por efecto de dilución.

A pesar de que la separación entre corteza y médula se hizo con especial cuidado, no se puede descartar la posibilidad de que tanto en una zona como en otra se encontraran algunas células de la región contraria, aunque estas últimas representarían una proporción tan pequeña, que pensamos no interfieren significativamente con nuestros resultados.

Hasta aquí podemos suponer que, tanto en corteza como en médula, hay poblaciones celulares que presentan actividad de la aromatasa. Sin embargo el determinar si hay una o varias estirpes celulares con esta capacidad, así como cual es su ubicación dentro del ovario fetal, implicaría elaborar otros modelos experimentales que, por una parte, nos permitieran aislar dichas poblaciones para trabajar con ellas independientemente y por otra, observar su distribución en la gónada fetal a lo largo del desarrollo embrionario.

Un aspecto que también nos llamó la atención en los ensayos realizados con testosterona tritiada, fue observar que prácticamente no hubiera transformación hacia androsteronediona, a pesar de que al trabajar con pregnenolona, se podía concluir que la enzima  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $17\beta$ -OHSD) estaba presente en los fetos estudiados. Pensamos que una posible explicación a este hecho podría ser que el sustrato no fuera suficiente y que hubiera una mayor afinidad de la aromatasa por la testosterona, favoreciéndose

así la formación de estradiol, que es un esteroide de suma importancia en el organismo femenino.

Por otra parte, al incubar testículos fetales de embriones de 4 y 5 cm. de long. C-R en condiciones idénticas a los ovarios fetales (datos no incluidos en los resultados), el principal producto encontrado fue la androstenediona (4 a 5 fmol) y no así el estradiol. Esto concuerda con lo reportado por otros investigadores que han efectuado estudios en torno a la esteroidogénesis en testículos de embriones de diversas especies, encontrando que la producción de estradiol en el testículo fetal, cuando existe es mínima o bien no se detecta (Reyes, F.I. et al., 1973; Mauleon, P. et al., 1977; George, F.W. et al., 1978; George, F.W. et al., 1980 y Shemesh, M. et al., 1978).

Esto último podría apoyar la explicación anteriormente expresada, en el sentido de que si la aromatasa tiene una mayor afinidad por la testosterona, al no estar presente esta enzima, o bien hallarse en cantidades ínfimas, como suponemos que ocurre en el testículo fetal; el sustrato en cuestión (testosterona), quedaría disponible para ser transformado por la enzima 17 $\beta$ -OHSD en androstenediona.

Ahora bien, como se hizo mención en párrafos anteriores, se empleó también pregnenolona tritiada como precursor, con el objeto de tener una visión más amplia de las vías esteroidogénicas y así poder definir posteriormente la metodología adecuada para estudiar mas a fondo la actividad



y localización de las enzimas implicadas en dichas vías durante el desarrollo embrionario.

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta fase experimental, observamos que tanto en corteza como en médula de ovarios fetales de bovino de 4 y 6 cm. de long. C-R, se encuentran metabolitos que demuestran la presencia de las principales enzimas involucradas en la esteroidogénesis ovárica y que tanto la vía de los  $\Delta^4$  como la de los  $\Delta^5$  están activas.

Sin embargo, en lo referente a los estrógenos, únicamente se encontró estrona en cantidades muy pequeñas y no así estradiol, a pesar de que aparentemente la cantidad de testosterona formada era suficiente como para que se transformara en este metabolito. Consideramos que nuestros datos son insuficientes para explicar este punto, por lo que pensamos que para aclarar esto, sería necesario realizar nuevos experimentos, utilizando un precursor más inmediato como, por ejemplo, la androstenediona.

Con el objeto de analizar también la actividad de la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa,  $\Delta^4$ - $\Delta^5$  Isomerasa ( $\Delta^4$ - $\Delta^5$ ,  $3\beta$ -OHSDH), se estableció la relación existente entre los metabolitos de la pregnenolona mas abundantes transformados por la vía de los  $\Delta^4$  y los resultantes de la vía de los  $\Delta^5$ . Utilizamos esta metodología porque consideramos más factible de este modo, establecer comparaciones entre los casos estudiados (ovarios de fetos de 4 y 6 cm. de long. C-R).

Dentro de los productos de la vía de los  $\Delta^4$  solo se tomaron en cuenta la progesterona y la androstenediona, por ser los más abundantes, ya que la  $20\alpha$  y la  $17\alpha$ -hidroxipro-gesterona se detectaron solo en cantidades muy pequeñas y no fue posible separar una de la otra con los métodos cromati-gráficos empleados. En lo referente a los metabolitos de la vía de los  $\Delta^5$ , solo consideramos a la dehidroepiandrosterona, por ser la que se encontró en mayor cantidad, a diferencia de la  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona que, además de ser menos abundante, no se pudo aislar satisfactoriamente de la testosterona, por lo que esta última tampoco se incluyó dentro de los productos de la vía de los  $\Delta^4$ .

De acuerdo con nuestros resultados, aunque la actividad de la  $\Delta^4$ - $\Delta^5$ ,  $3\beta$ -DHS DH se detectó tanto en corteza como en médula, fue mayor en esta última, en una proporción de prácticamente 2:1, en los dos casos estudiados. Esto fue confirmado por histoquímica y en este aspecto nos parece importante hacer notar que la actividad de dicho complejo enzimático se localiza fundamentalmente en la zona de transición entre corteza y médula, con predominio en la segunda, al menos para los ovarios de fetos de 4 y 6 cm. de long. C-R.

A pesar de las diferencias mencionadas, pensamos que los datos obtenidos no son suficientes para apoyar alguna conclusión en este sentido, por lo que haría falta trabajar etapas gestacionales posteriores, con el objeto de observar si hay variaciones tanto en la actividad de la  $\Delta^4$ - $\Delta^5$ ,  $3\beta$ -

OHSDH, como en su ubicación dentro del ovario fetal a lo largo del desarrollo embrionario. Asimismo, sería importante utilizar algún metabolito mas inmediato como la dehidroepiandrosterona, para estudiar en forma mas directa la actividad de este complejo enzimático.

REFERENCIAS.

- 1 Bjersing, L. (1967). On the morphology and endocrine function of granulosa cells of ovarian follicles in corpora lutea. Acta Endocrinol. (Suppl) 125: 5-23.
- 2 Bloch, E. (1964). Metabolism of 4-<sup>14</sup>C-progesterone by human fetal testis and ovaries. Endocrinology, 74: 833-845.
- 3 Bloch, E. (1967). The conversion of 7-<sup>3</sup>H-pregnenolone and 4-<sup>14</sup>C-progesterone to testosterone and androstenedione by mammalian fetal testes in vitro. Steroids, 9: 415-430.
- 4 Brodie, A.M.H. (1983). Biosynthesis, metabolism and secretion of ovarian steroid hormones. En: THE OVARY. Editado por Giovan B. Serra. Raven Press (New York), pp. 1-16.
- 5 Dorrington, J. H., Moon, Y. S. and Armstrong, D.T. (1975). Estradiol-17 $\beta$  biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulation by Follicle-Stimulating Hormone. Endocrinology, 97: 1328-1331.
- 6 Erickson, G.F. and Ryan, K.J. (1976). Stimulation of testosterone production in isolated rabbit thecal tissue by LH/FSH, dibutyl cyclic AMP, PGE<sub>2</sub> and PGE<sub>1</sub>. Endocrinology, 99: 452-458.
- 7 Falck, B. (1959). Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants. Acta Physiol. Scand. 47, Suppl. (163): 1-101.
- 8 Fortune, J.E. and Armstrong, D.T. (1977). Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrus rat follicles. Endocrinology, 100: 1341-1347.
- 9 George, F.W. and Wilson, J.D. (1978). Conversion of androgen to estrogen by the human fetal ovary. J. Clin. Endocrinol. Metab. 47: 550-555.
- 10 George, F.W. and Wilson, J.D. (1980). Endocrine differentiation of the fetal rabbit ovary in culture. Nature, 283: 861-863.
- 11 George, F.W., Milewich, L., and Wilson, J.D. (1978). Oestrogen content of the embryonic rat ovary. Nature, 274: 172-173.
- 12 Goldstein, J.L. and Wilson, J.D. (1975). Genetic and hormonal control of male sexual differentiation. J. Cell. Physiol. 85: 365.
- 13 Granner, D.K. (1986) Hormonas de la Glandula Suprarrenal. En BIOQUIMICA DE HARPER. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. Mexico, D.F. 40: 557-562.
- 14 Granner, D.K. (1986) Hormonas de las gonadas. En BIOQUIMICA DE HARPER. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. Mexico, D.F. 41: 579-595.
- 15 Jesso, M., Picard, J.Y. and Tran, D. (1977). The Antiulterian Hormone. Recent Prog. Horm. Res. 33: 117-167.
- 16 Jost, A. (1953). Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. Recent Prog. Horm. Res. 8: 379-418.
- 17 Kofman-Alfaro, S., Merchant-Larios, H., y Perez-Palacios, B. (1982). Diferenciación sexual. I. Bases biológicas del dimorfismo sexual. Rev. Invest. Clin. 34: 349-359.
- 18 Liu, Y.I. and Hsueh, A.J.W. (1986). Synergism between granulosa and thecal-interstitial cells in estrogen biosynthesis by gonadotropin-treated rat ovaries: studies on the two-cell, two-gonadotropin hypothesis using steroid antisera. Biol. Reprod. 35: 27-36.
- 19 Makris, A. and Ryan, K.J. (1975). Progesterone, androstenedione, testosterone, estrone and estradiol synthesis in hamster ovarian follicle cells. Endocrinology, 96: 694-701.
- 20 Mauleon, P., Bezaud, J. and Terouj, M. (1977). Very early and transient 17 $\beta$ -estradiol secretion by the fetal sheep ovary. In vitro study. Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. 17(3 A): 399-401.
- 21 Merchant-Larios, H. (1984). Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. En: ULTRASTRUCTURE OF REPRODUCTION. Editado por Van Blerkoz, J., Motta, P.M. Martinus Nijhoff Pub. (Boston), 1984. pp. 19-30.
- 22 Merchant-Larios, H. (1978). Ovarian Differentiation. En: THE VERTEBRATE OVARY. Editado por E.R. Johns. Plenum Press. (New York). pp. 47-80.

- 23 Milewich, L., George, F.W., Wilson, J.D. (1977). Estrogen formation by the ovary of the rabbit embryo. Endocrinology. 100: 187-196.
- 24 Noumura, T., Weisz, J. and Lloyd, C.W. (1966). In vitro conversion of 7-<sup>3</sup>H-progesterone to androgens by the rat testis during the second half of fetal life. Endocrinology. 78: 245-253.
- 25 Picon, R., Pelloux, M.C., Benhaim, A. and Gloaguen, F. (1985). Conversion of androgen to estrogen by the rat fetal and neonatal female gonad: effects of dcAMP and FSH. J. Steroid. Biochem. 23: 995-1000.
- 26 Raeside, J. I. (1985). Steroidogenesis and gonadal differentiation in the fetal pig. Archiv. Anat. micr. Morphol. exper. 74:87-90.
- 27 Reyes, F.I., Winter, J.S.D. and Faiman, C. (1973). Studies on human sexual development. I. Fetal gonadal and adrenal sex steroids. J. Clin. Endocrinol. Metab. 37: 74-78.
- 28 Ryan, J. K. and Petro, Z. (1966). Steroid biosynthesis by human ovarian granulosa and thecal cells. J. Clin. Endocrinol. 26: 46-52.
- 29 Shewesh, M., Ailenberg, M., Milaguir, F., Ayalon, N., and Hansel, W. (1978). Hormone secretion by cultured bovine pre- and postimplantation gonads. Biol. Reprod. 19: 761-767.
- 30 Sholl, S.A. and Goy, R.W. (1978). Androgen and estrogen synthesis in the fetal guinea pig gonad. Biol. Reprod. 18: 160-169.
- 31 Short, R.V. (1962). Steroids in the follicular fluid and the corpus luteum of the mare. A "two cell type theory of ovarian steroid synthesis". J. Endocr. 24: 59-63.
- 32 Stryer, L. (1985). BIOQUIMICA. Ed. Reverte. Barcelona. 20: 435-439.
- 33 Takahashi, H., Duleba, A.J., Yuen, B.O., and Moon, Y.S. (1984). Steroidogenic capabilities of various compartments of rat ovarian follicles in culture. Steroids. 44: 337-348.
- 34 Weniger, J.P., Chouraqui, J. and Zeis, A. (1984). Conversion of testosterone and progesterone to oestrone by the ovary of the rat embryo in organ culture. J. Steroid. Biochem. 31: 347-349.