



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

METABOLISMO DE ESTEROIDES EN LAS CELULAS
DE LA TECA Y CELULAS DE LA GRANULOSA DEL
FOLICULO OVARICO DE PORCINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

VICTOR HIPOLITO LEYVA ISLAS



DR. MARCO ANTONIO JUAREZ OROPEZA

DR. ENRIQUE PEDERNERA ASTEGIANO

DR. LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO

MEXICO, D. F.

1994

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 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.

DEDICATORIA

A Marina por los largos años de lucha, espera y por su apoyo sin igual.

A mis hijos, Víctor Hugo y Karina.

A mi madre, cariñosamente.

A mis maestros, especialmente al Dr. Eduardo Posadas.

A todas aquellas personas que de alguna manera colaboraron en la culminación del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A los Departamentos de Bioquímica y de Embriología en la Facultad de Medicina de la UNAM por la oportunidad brindada.

A mis asesores, los doctores, Enrique Pedernera y Luis Alberto Zarco por su paciente guía para la elaboración del presente trabajo.

Especialmente al Dr. Marco Antonio Juárez, director de esta tesis.

A la M. en C. Carmen Méndez Herrera por su valiosa colaboración en el manejo del material biológico.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM por la formación recibida.

CONTENIDO

	<u>página</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
Origen embrionario	2
Organización histológica del ovario adulto	3
El folículo ovárico	4
Los folículos son la unidad funcional del ovario	4
Desarrollo folicular	5
Panorama del metabolismo de esteroides en el ovario	11
Células esteroideogénicas	11
Clases de Hormonas Esteroides Foliculares	13
Clasificación química	13
Clasificación biológica	14
Enzimas esteroideogénicas y patrones de biosíntesis	16
Citocromo P450 _{scc}	17
3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/5-4 isomerasa (3 β -HSD)	19
Citocromo P450 17 α -hidroxilasa (P450 _{c17})	20
Aromatasa (P450 _{arom})	21
17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD)	22
JUSTIFICACION	24
OBJETIVOS	25
HIPOTESIS	26
MATERIAL Y METODOS	27
Obtención de las gónadas	27
Disección de folículos	27

	<u>Página</u>
Separación de las capas foliculares	27
Disgregación de las células	27
Conteo celular	29
Metabolismo de esteroides	29
Extracción de los esteroides	31
Separación e identificación de los metabolitos	31
RESULTADOS	36
Metabolismo de la pregnenolona	36
Metabolismo de la dehidroepiandrosterona	38
Metabolismo de la androstendiona	41
Metabolismo de la Testosterona	43
DISCUSION	45
Obtención de las Suspensiones Celulares de Folículos en Desarrollo ...	45
Metabolismo de Esteroides Exógenos Radiomarcados	46
Actividad de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/5-4 isomerasa (3 β -HSD)	47
Actividad de la enzima 17 α -hidroxilasa (P450c17)	48
Actividad de la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) ..	50
Actividad de Aromatasa (P450arom)	51
Metabolismo reductivo de los andrógenos	53
Metabolito desconocido	54
Heterogeneidad Folicular	56
CONCLUSIONES	58
LITERATURA CITADA	61

RESUMEN

LEYVA ISLAS, VICTOR HIPOLITO. Metabolismo de esteroides en las células de la teca y células de la granulosa del folículo ovárico de porcino (bajo la dirección de: Marco Antonio Juárez Oropeza, Enrique Pedernera Astegiano y Luis Alberto Zarco Quintero).

En el folículo ovárico de varias especies, la producción de estrógenos es efectuada por la acción coordinada de teca y granulosa, a este hecho se le conoce como "la teoría de las dos células-dos gonadotropinas para la producción de estrógenos". En el porcino, no ha sido posible establecer claramente la participación de las poblaciones foliculares en la síntesis de estrógenos. El objetivo del presente trabajo fue establecer las capacidades esteroideogénicas de ambos tipos celulares mediante el metabolismo de la pregnenolona, dehidroepiandrosterona, androstendiona y testosterona, tritio marcadas, incubadas con y sin hCG y/o xantinas, durante 60 ó 120 minutos. La separación de los esteroides producidos se realizó por cromatografía en capa delgada. Los resultados del metabolismo de los precursores en las células de la teca mostraron mayor síntesis de progesterona, dehidroepiandrosterona, androstendiona y, poco estradiol y estrona, mientras que las células de la granulosa sintetizaron principalmente androstendiona, estrona, estradiol, esteroides sulfatados y andrógenos 5α -reducidos. De los resultados anteriores se concluye que en células de la teca se localizan preferentemente las actividades enzimáticas de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/5-4 isomerasa, 17α -hidroxilasa, y en menor grado 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y aromatasa. En células de granulosa se observó actividad de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/5-4 isomerasa, 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, aromatasa, 5α -reductasa, y posiblemente una sulfotransferasa. La conclusión final que se obtiene es que la teoría bicelular no es totalmente aplicable para el porcino ya que la teca produce también estrógenos, aunque en menor proporción.

INTRODUCCION

Los ovarios son los órganos encargados de la actividad reproductiva de las hembras, en los mamíferos éstos son órganos pares que llevan a cabo funciones endócrinas y exócrinas. Las primeras incluyen la producción de estrógenos y progesterona, mientras que las segundas están relacionadas con la formación de los gametos femeninos (3,12).

Para llevar a cabo dichas funciones, el ovario requiere la participación coordinada de todas sus células, mediante mecanismos que aún no son completamente entendidos; por tal motivo, antes de describir el metabolismo de esteroides en el folículo ovárico del porcino, se presenta una breve descripción morfológica del ovario, incluyendo aspectos embriológicos, histológicos y del desarrollo folicular.

Origen embrionario

En los animales vertebrados el ovario se origina a partir de la placa del mesodermo, en las denominadas crestas genitales, de donde se originan las células somáticas del estroma ovárico y las células foliculares del ovario adulto. Las células de la granulosa derivan principalmente de las células de la red intraovárica, y las células de la teca aparentemente se diferencian de las células mesenquimales en el estroma ovárico, ya que la capa de la teca no esta presente en los folículos primarios, pero se forma a medida que el folículo crece y madura (2,12).

crece y madura (2,12).

Las células germinales primordiales son las que darán origen al gameto femenino (ovocito). Es posible que su origen anteceda la formación de las hojas embrionarias (2,25).

Organización histológica del ovario adulto

El ovario está cubierto por un epitelio de superficie que es modificación de la capa peritoneal visceral y que se continua con el mesovario.

Los ovarios consisten de dos zonas distintas; una corteza externa o zona parenquimatosa y la médula interna o zona vascular (3,25).

En el caso de los ovarios de porcino, la corteza presenta comúnmente abundantes prominencias redondeadas de diferentes tamaños (las proyecciones de los folículos y cuerpos lúteos) que dan al órgano una apariencia lobulada irregular (15,25).

La corteza contiene numerosos folículos en diferentes estados de desarrollo, cuerpos lúteos, así como células intersticiales y elementos estromales. Aunque las fibras del tejido conjuntivo de la túnica albugínea se continúan con las del tejido estromal, el tejido conjuntivo debe considerarse como un tejido especializado, donde se encuentran diferentes células típicas, tejido conjuntivo areolar y fibroblastos agregados. Estos pueden ser paralelos a la superficie y estar dispuestos alrededor de los folículos o de vasos sanguíneos con los que están relacionados. Los fibroblastos de esta región no son comunes, ya que se convierten con facilidad en macrófagos, y

vaina folicular en relación con los folículos en desarrollo. En este último caso tienen funciones secretoras y nutricionales. Estas células epitelioides se vuelven a convertir con facilidad en fibroblastos del estroma (3,15,25).

La médula se caracteriza por poseer grandes vasos sanguíneos, linfáticos, nervios y algunos restos embrionarios. Se trata de un tejido conjuntivo areolar con fibras elásticas y reticulares. Los constitutivos medulares se continúan con las uniones mesováricas. Los restos embrionarios son parte de la red ovárica, que son cordones sólidos y cortos de células epiteliales (3,15,25).

El Folículo Ovárico

Los folículos son la unidad funcional del ovario.- La función de cada folículo consiste en proveer el soporte necesario para que la célula germinal femenina u ovocito alcance su máximo potencial, para que de unirse con una célula germinal masculina sea capaz de producir un embrión que se desarrollará hasta el nacimiento de un nuevo individuo (12,15).

Otra función importante del folículo es la producción de hormonas que están relacionadas estrechamente con el proceso reproductivo. Estas funcionan como hormonas en el sentido clásico, siendo transportadas del lugar donde se sintetizan, que vía circulación sanguínea van a actuar sobre una amplia variedad de "órganos blanco", no solo comprendiendo al sistema reproductor, sino también otros órganos y sistemas incluyendo el sistema nervioso central, sistema músculo-esquelético, el

sistema cardiovascular, hígado, tejidos adiposo y cutáneo (12,25).

Además de su acción sobre órganos lejanos del ovario, los esteroides producidos por las células foliculares también actúan localmente dentro de los folículos en donde son producidos, actuando así como agentes "parácrinos" o "autócrinos", actuando sobre o dentro de las células que los están produciendo, respectivamente (12).

Desarrollo folicular.- La clasificación de los estadios de desarrollo folicular se realiza con base en la morfología del ovocito, tamaño folicular, número y organización de células de la granulosa y teca foliculares (12). Aunque existen diferentes formas de clasificar el desarrollo folicular dependiendo de la especie animal de que se trate, aquí se presenta una descripción general, que es válida para el porcino y otras especies animales, figura 1.

- Folículos primordiales: los ovocitos se encuentran en la profase de la meiosis y están rodeados por una capa de células pregranulosas planas. Estos constituyen la reserva de folículos en reposo que progresivamente son activados durante la etapa reproductiva, transformándose continuamente en folículos primarios (3,14,15).

- Folículos primarios: el ovocito esta rodeado por una sola capa de células granulosas cuboidales (las

descendientes de las células pregranulosas). Aquí es donde se inicia el crecimiento folicular que pueden culminar en la ovulación, o más frecuentemente en atresia en cualquier estadio de su desarrollo posterior (3,15).

- Folículos secundarios: la capa única de células granulosas se vuelve multilaminar y está separada del ovocito por un material amorfo PAS-positivo, llamado "zona pelúcida", que en realidad es una lámina basal muy gruesa. Las células del estroma se diferencian en dos capas: la teca folicular interna y la teca folicular externa. Las células tecales están separadas de las células de la granulosa por una membrana basal, llamada membrana cristalina. La teca folicular interna consiste de células epitelioides grandes y una extensa red vascular. La teca folicular externa esta constituida principalmente por una capa de células fibroblásticas (3,14,15).

- Folículos terciarios: el desarrollo del folículo terciario ocurre en dos fases, durante la primera, el crecimiento del folículo y del ovocito están lineal y positivamente correlacionados. La segunda fase se inicia poco antes de la formación de la cavidad antral, caracterizada por una intensa actividad mitótica de células de la teca y de la granulosa. En este período se forman unas fisuras intercelulares

que confluyen progresivamente para formar el antro folicular, teniendo lugar el continuo crecimiento del folículo tanto por la actividad mitótica celular como por el creciente volumen de líquido folicular (3,14). Dependiendo de su actividad esteroidogénica, algunos folículos terciarios continúan su desarrollo hacia folículos "preovulatorios" mientras que algunos otros permanecen como "no preovulatorios".

Independientemente del desarrollo del folículo, éste contiene aún un ovocito primario permaneciendo en la primera profase meiótica (3).

Generalmente es aceptado que los folículos antrales y especialmente, al empezar a formarse los folículos preovulatorios, son la fuente más importante de esteroides ováricos durante el ciclo estral (14).

- El folículo maduro: es una estructura muy grande, la cual sobresale de la superficie ovárica y se extiende hasta la profundidad de la corteza. El antro es grande y su pared adelgazada consiste de los componentes celulares e intercelulares antes mencionados (3).

- Ovulación: la ovulación consiste en la ruptura del folículo y la liberación del ovocito. En tanto que el mecanismo preciso de la ovulación no se ha determinado, se produce una lesión de la pared folicular debido a la hidrólisis enzimática del

tejido conjuntivo por una colagenasa estimulada por LH. La presión intrafolicular del líquido no se relaciona con el proceso ovulatorio (3,15).

- Atresia Folicular: la atresia folicular es un fenómeno universal, característico de los vertebrados mamíferos y no mamíferos. En estos últimos los folículos son obliterados por la actividad fagocítica de la granulosa, la cual degenera. En el caso de los mamíferos, los cambios morfológicos son más sutiles (14).

Debido a la dificultad que representa identificar cuando se inicia la atresia, algunos investigadores han propuesto criterios para definir su inicio. Uno de éstos sería la presencia de una o dos células granulosas picnóticas en un corte transversal del folículo. Otro criterio consiste en la presencia de 5% de células granulosas picnóticas en el corte transversal del folículo. También es posible hacer la diferenciación entre folículos sanos y atrésicos basados principalmente en la vascularización de la teca, la integridad de la membrana granulosa y en la translucidez del folículo (14).

No todos los folículos en desarrollo terminan en ovulación, muchos sufren una atresia folicular. Esta puede presentarse en cualquier punto del desarrollo folicular (3,15). Durante el estadio de folículo primordial la disolución del huevo y la pregranulosa

no dejan señales de cicatrización, solo se desintegran.

En los estadios más avanzados del desarrollo folicular se produce una deformación quística seguida por la formación de una cicatriz, el cuerpo atrésico (3).

Los procesos degenerativos empiezan desde el ovocito hacia la periferia. El ovocito se licúa, en tanto que la zona pelúcida se engruesa y repliega, las células de la membrana se deforman provocando que las paredes del folículo se colapsen, acompañado por una invasión de tejido conjuntivo y vascular del antro folicular. La membrana cristalina se engruesa y las células de la teca folicular interna pueden sufrir hipertrofia y cambios parecidos a las células luteínicas de la teca (detalles en cuerpo lúteo). En este estadio el folículo atrésico puede considerarse como una glándula temporal. Las células foliculares se disponen en cordones alrededor del huevo en degeneración. La actividad fagocitaria de los histiocitos asociados y la actividad fibrolítica de los fibroblastos completan la transición del cuerpo atrésico (3,14).

- Cuerpo lúteo: después de la ruptura de la pared ovárica y los elementos murales que componen al folículo, el huevo es expulsado hacia el oviducto. Las porciones restantes del folículo no se degeneran

sino que sufren cambios pronunciados que conducen a la formación del cuerpo lúteo. Las paredes foliculares se colapsan y las células de la granulosa se protruyen hacia el lumen residual. La hemorragia que acompaña la ovulación, al cabo de un tiempo coagula y la estructura de transición se conoce como cuerpo hemorrágico. Las células de la granulosa proliferan, se hipertrofian y se transforman en células luteínicas de la granulosa. En la cerda y la oveja no se acumula el pigmento lipídico amarillo conocido como luteína, la acumulación de otros lípidos marca el cambio de la membrana granulosa a células luteínicas. La invasión de esta región por células estromales y vasos sanguíneos elimina el coágulo que es sustituido por fibras reticulares que convierten el área en una glándula muy vascularizada (3,25).

Las células de la teca folicular interna se convierten también en células productoras de lípidos, células luteínicas de la teca. Estas células son más pequeñas que las de la granulosa y se encuentran dispersas en forma periférica o en paquetes septales interrelacionados con otro tipo de células predominantes. El proceso por el cual la granulosa y las células tecales se convierten en células luteínicas se denomina luteinización. La hipertrofia e hiperplasia son factores necesarios para el proceso. Ya sea que la luteína esté presente o no, la

estructura resultante se conoce como cuerpo lúteo o cuerpo amarillo (3,15).

El destino del cuerpo lúteo depende de si hay fertilización o no la hay. En caso de no haberla, el cuerpo lúteo poco a poco es reemplazado por tejido conjuntivo convirtiéndose en cuerpo blanco (*corpus albicans*) o cuerpo fibroso (3).

Si ocurrió la fertilización, el cuerpo lúteo se mantiene activo durante la gestación por un período variable. En algunas especies el cuerpo lúteo es necesario en toda la gestación, incluido el porcino (15), en otras puede eliminarse en diferentes tiempos sin provocar daños en el útero grávido (3).

Panorama del Metabolismo de Esteroides en el Ovario

Células esteroideogénicas.- Los principales tipos celulares involucrados en la esteroideogénesis folicular son básicamente dos:

- A).- Las células con respuesta secretora a la hormona luteinizante (LH), que comprenden las células de la teca interna de la pared folicular y las células intersticiales del estroma ovárico (12). Las células tecales de la cerda no sobreviven como células intersticiales (14).

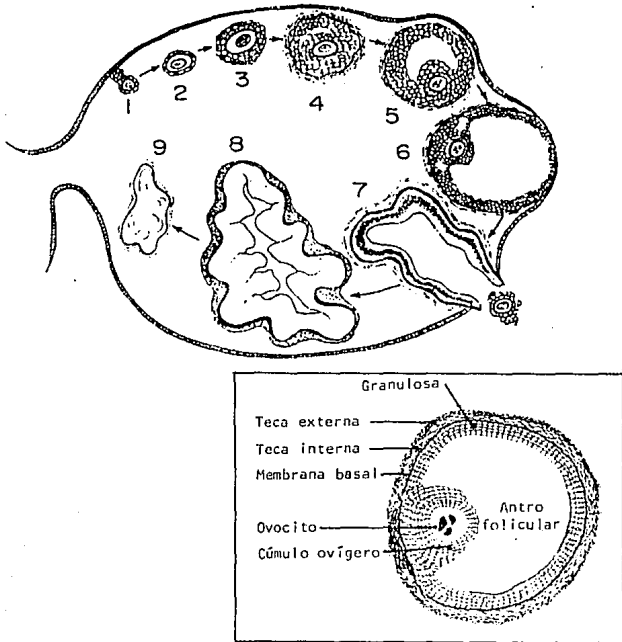


FIGURA 1. Esquema del ovario que muestra el origen y el desarrollo de los folículos ováricos. 1) Oogonio rodeado de células prefoliculares. 2) Folículo primario. 3) a 5) Folículos en maduración. 6) Folículo maduro. 7) Folículo roto. 8) Cuerpo amarillo. 9) *Corpus albicans*. En el recuadro se puede observar el folículo maduro con sus diferentes capas. Tomado de Leeson (19).

B).- Las células que responden a la hormona folículo estimulante (FSH), que consisten exclusivamente de las células de la capa granulosa, las cuales solo después de la maduración folicular adquieren la capacidad de respuesta a la hormona luteinizante.

La producción de hormonas esteroides es una de las funciones que realiza el folículo ovárico. Los esteroides foliculares pueden tener efectos endócrinos o sistémicos, locales o parácrinos y autócrinos y tienen importantes funciones relacionadas con la reproducción, por ejemplo, actúan en los centros cerebrales que controlan el comportamiento sexual para hacer que las hembras estén dispuestas para el apareamiento a la vez que ocurre la maduración del folículo y la liberación del ovocito (12,15,25).

Clases de Hormonas Esteroides Foliculares.- Las hormonas esteroides foliculares pueden ser clasificadas por su estructura química o por sus principales acciones fisiológicas (12).

- Clasificación química: se basa en que las hormonas esteroides son derivados de una molécula compleja formada por tres anillos ciclohexano (A,B,y C) y un anillo ciclopentano (D), a este molécula anillada se la conoce como "núcleo ciclopentano perhidrofenantreno" o núcleo de los esteroides, al cual se unen componentes adicionales que varían de acuerdo al esteroide que se trate. Los esteroides

ováricos están relacionados entre sí y pueden considerarse derivados de alguno de los siguientes compuestos (12): colestán (C_{27}), pregnán (C_{21}), androstan (C_{19}) y estrán (C_{18}), figura 2.

- Clasificación biológica: los esteroides ováricos también pueden ser clasificados con base en su principal función biológica, formando tres grupos, el de las progestinas, los andrógenos y los estrógenos, que están representados por compuestos procedentes de las series C_{21} - (pregnán), C_{19} - (androstan) y C_{18} - (estrán), respectivamente (12).

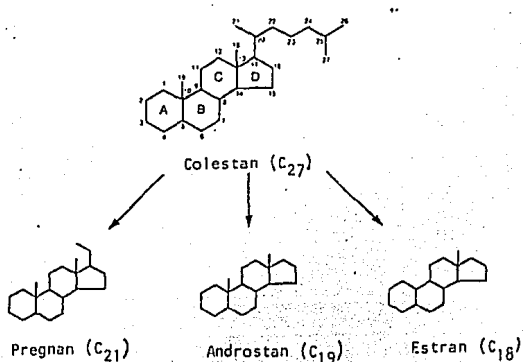


FIGURA 2. Estructuras básicas de las series Pregnan, Androstan y Estrán, utilizadas en la clasificación química de los esteroides. Tomado de Gore-Langton (12)

Precursor de los esteroides.- Los esteroides foliculares se producen a partir del colesterol obtenido de una de tres posibles fuentes: (a) colesterol preformado, tomado directamente de la sangre, a partir de lipoproteínas circulantes; (b) colesterol preformado, almacenado como colesterol libre, como un constituyente de las membranas celulares, o liberado de ésteres de colesterol almacenados dentro de gotas de lípidos en el citoplasma; y (c) colesterol sintetizado de novo en la célula ovárica a partir del acetato derivado del metabolismo de carbohidratos, grasas o proteínas dentro de la célula (12).

Progestinas.- Las principales progestinas son dos. Una es la pregnenolona, que es la más importante progestina producida por el folículo ovárico debido a que es el precursor de todas las demás hormonas esteroides. La segunda, es la progesterona que es la más abundante progestina producida por el folículo ovárico, ésta es secretada por los folículos como un intermediario biosintético en todas sus etapas de crecimiento y desarrollo y también como un producto final en los períodos pre y postovulatorio. La principal función de la progestinas es la de mantener la gestación. Otros esteroides C_{21} - de origen folicular incluyen 17 α -hidroxiprogesterona, (que es el precursor inmediato de los andrógenos aromatizables), 20 α -dihidroxiprogesterona y los 17 α -, 20 α -, y 17 α -, 20 β -pregnandioles (12).

Andrógenos.- En el macho estos esteroides son los responsables de los caracteres sexuales secundarios, entre otras funciones. La identificación de androstenediona y testosterona en el líquido folicular, seguido por la demostración de síntesis de estos compuestos a partir de precursores radiomarcados, establecieron que las células foliculares son una fuente significativa de andrógenos ováricos y que éstos son los precursores inmediatos de los estrógenos, el 17β -estradiol y la estrona (12).

Estrógenos.- Fisiológicamente los estrógenos 17β -estradiol y estrona son los más importantes esteroides foliculares, ya que además de inducir la receptividad sexual en la hembra de mamífero tiene otras importantes funciones sobre su fisiología reproductiva (12).

Enzimas esteroideogénicas y patrones de biosíntesis.- Mucho de nuestro actual conocimiento sobre la síntesis de los esteroides se ha generado de investigaciones en tejidos diferentes del ovario. En particular, estudios con corteza adrenal, testículo y placenta humana han contribuido al entendimiento de las enzimas esteroideogénicas y sus mecanismos de control. La evidencia disponible indica un alto grado de similitud entre los procesos que son comunes a los diferentes tejidos esteroideogénicos, incluyendo al folículo ovárico (12), figura 3.

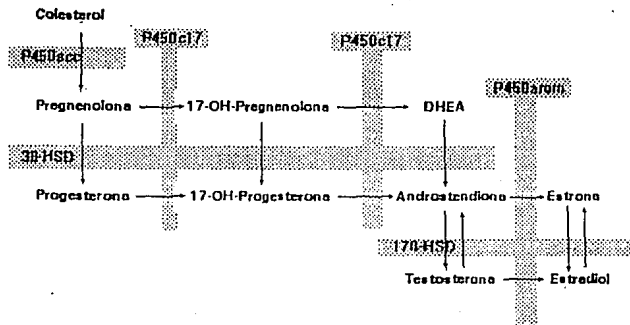


FIGURA 3. Vías de biosíntesis de las hormonas esteroideas por las células foliculares. Las flechas marcan el sentido de conversión del sustrato en el producto por la enzima indicada en el área sombreada. Modificado de Hanukoglu (17)

Citocromo P450scc (side-chain cleavage, P450scc)..- Este sistema enzimático cataliza el primer paso y el limitante en la biosíntesis de las hormonas esteroideas, ya que convierte el colesterol a pregnenolona en tres oxidaciones sucesivas (hidroxilaciones al C22, seguido por el C20, y finalmente separación de la cadena lateral entre C20 y C22). Los intermediarios hidroxilados del colesterol se encuentran unidos muy fuertemente a la enzima y no muestran una disociación significativa. En contraste, el producto final, la pregnenolona tiene una constante de disociación de 40 a 600 veces mayor que

sus intermediarios, facilitando su liberación de la enzima (12,17).

El sistema enzimático que cataliza esta reacción está localizado en la membrana interna de la mitocondria. Se trata de un complejo enzimático formado por tres componentes: el citocromo P450_{scc} (separador de la cadena lateral) que es una oxigenasa terminal (aceptor de electrón), una flavoproteína que contiene un dinucleótido de flavina y adenina y, la hemo-proteína que contiene azufre (luteodoxina o adrenodoxina en células luteínicas o adrenales, respectivamente) cuya función consiste en introducir un electrón entre los otros dos componentes. La reacción utiliza nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) generado dentro de la mitocondria por intermediarios del ciclo de oxidación de Krebs o a partir de ácidos grasos. Se utilizan tres moles de (NADPH) y 3 de oxígeno por cada mol de colesterol que se somete a la separación de la cadena lateral (12,17), figura 4.

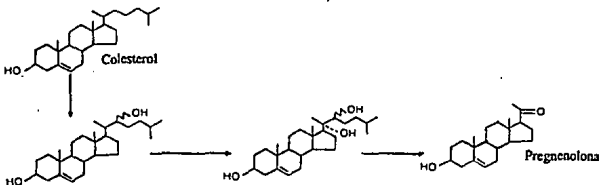


FIGURA 4. Reacción catalizada por la enzima P450_{scc}.

La presencia del citocromo P450_{sc} se localiza en las tres zonas de la corteza adrenal, en las células de Leydig del testículo y en la teca interna del folículo ovárico, su presencia en la capa granulosa depende de la etapa de crecimiento del folículo (preovulatorio) (17).

3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/5-4 isomerasa (3 β -HSD).- Se trata de un complejo enzimático microsomal, la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/5-4 isomerasa. La actividad de estas dos enzimas en los tejidos esteroidogénicos de los mamíferos, incluyendo el ovario, no han sido separadas y parece que trabajan fisiológicamente como una sola entidad (12,17). Esta enzima tiene dos actividades catalíticas principales, convertir los esteroides 3 β -hidroxi- en 3-ceto- y la posición 5-ene hacia 4-ene. Esta enzima puede usar como substratos, pregnenolona, 17-OH-pregnenolona o dehidroepiandrosterona (DHEA) para transformarlos en progesterona, 17-OH-progesterona o androstenediona, respectivamente (12,17), figura 5.

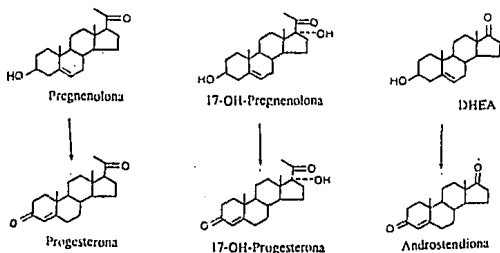


FIGURA 5. Reacciones catalizadas por la enzima 3 β -HSD.

Estudios inmunohistoquímicos han revelado que la 3 β -HSD se localiza en las mismas células esteroidogénicas que la P450_{scc}, en las tres zonas de la corteza adrenal, en las células intersticiales de Leydig y en la teca interna del folículo ovárico (12,17).

Estudios realizados *in vitro* en células foliculares del porcino reportan que en células granulosas estimuladas con gonadotropinas existe producción de progesterona y que las células de la teca estimuladas con LH también producen progesterona, aunque en estas últimas su producción es substancialmente menor bajo todas las condiciones ensayadas (7,14,26).

Citocromo P450 17 α -hidroxilasa (P450c17).- Esta enzima cataliza dos importantes reacciones sobre los esteroides C₂₁ o progestinas: a) la 17 α -hidroxilación y, b) la separación de la cadena lateral entre C17 y C20. Mientras que la 17 α -hidroxilación es un paso que se requiere para la biosíntesis del cortisol, ambos pasos son esenciales para la síntesis de los andrógenos aromatizables C₁₉, dehidroepiandrosterona y androstenediona (17), figura 6.

Los análisis inmunohistoquímicos muestran que el citocromo P450c17 se encuentra en las zonas fasciculada y reticular pero no en la zona glomerular de la glándula adrenal porcina (17).

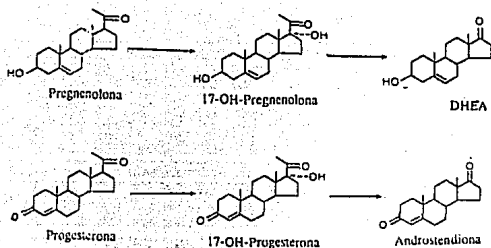


FIGURA 6. Reacción catalizada por la enzima P450c17.

En el ovario, el citocromo P450c17 se encuentra en las células de la teca interna del folículo. Por lo tanto, las células de la teca interna pueden sintetizar andrógenos, mientras que las células de la granulosa que producen los estrógenos son dependientes del precursor andrógeno proporcionado por la teca interna. Este proceso se conoce como la hipótesis de las dos células para la producción folicular de estrógenos (8,17,24). En el porcino, el principal andrógeno producido por la teca interna es la androstenediona, que después se transfiere a la granulosa donde es convertida a testosterona para ser aromatizada a estradiol (7,10).

Aromatasa (P450arom).— La enzima P450arom cataliza la conversión de testosterona y androstendiona en 17 β -estradiol y estrona, respectivamente, figura 7.

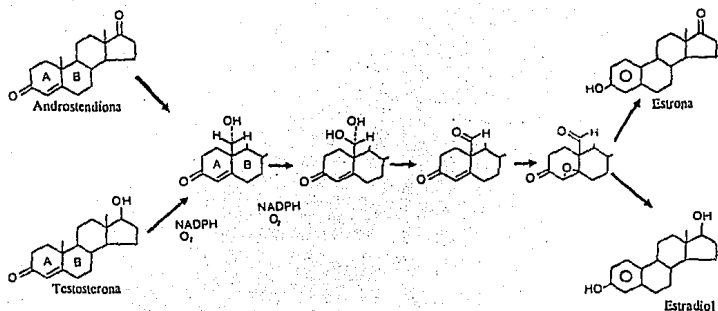


FIGURA 7. Reacción catalizada por la enzima P450arom.
Modificado de Gore-Langton (12).

En el ovario, la aromatasa está expresada en las células de la granulosa que son el sitio de mayor producción de estrógenos en las hembras, aunque también se encuentra ligeramente expresada en tejidos diferentes de las gónadas como son: los adipocitos, el pezón, sistema nervioso central, piel y placenta (17).

En el folículo de porcino se ha detectado la actividad de aromatasa en las células de la teca y de la granulosa, ya que se ha reportado la producción de 17β-estradiol, como estrógeno principal, en ambos tipos de células (7,10,26).

17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (*17β*-HSD).- Esta enzima también se conoce como 17-ceto esteroide reductasa. Cataliza la

conversión reversible de los grupos 17-ceto- y los 17 β -hidroxi- de los andrógenos y estrógenos, incluyendo DHEA, 5-androst-3,17-diol, androstenediona, testosterona, estrona y 17 β -estradiol. La dirección de ésta reacción es dependiente del substrato y del cofactor (17), figura 8.

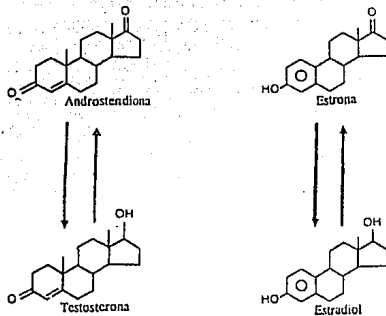


FIGURA 8. Reacción catalizada por la 17 β -HSD.

Se han realizado estudios inmunohistoquímicos utilizando anticuerpos contra la 17 β -HSD testicular que han ubicado esta enzima en la teca interna del folículo ovárico de la rata sin localizarse en la capa granulosa ni en el cuerpo lúteo. En el testículo se ha localizado en las células intersticiales de Leydig (17).

JUSTIFICACION

Se ha demostrado en diversas especies (rata, bovino, ovino) que la producción de estrógenos en el folículo ovárico es una tarea realizada por la cooperación de dos poblaciones celulares. Las células de la teca sintetizan los andrógenos, los que posteriormente son aromatizados por las células de la granulosa (4,9,21). En otras especies, como el porcino y el humano, se ha observado producción de estrógenos en la teca folicular (26,29), lo que no concuerdan con la teoría clásica bicelular (8,24), como se ha documentado anteriormente.

Muchos estudios *in vivo* e *in vitro* se han realizado para determinar la esteroidogénesis folicular en el porcino introduciendo variables como son animales sin tratamiento previo (5), estímulo hormonal por diferentes lapsos de tiempo previo a la obtención de las gónadas (1,7) y recientemente la estimulación *in vitro* con diferentes factores de crecimiento (5), en los cuales la detección de los esteroides producidos se ha realizado invariablemente por el método de radioinmunoanálisis (RIA) (1,7,9,24,26,30). Este método permite detectar cantidades pequeñas de esteroides por medio de anticuerpos con alta especificidad para cada uno de los metabolitos esperados.

Los estudios sobre el metabolismo de esteroides y su detección por el método de cromatografía en capa delgada son escasos.

La información generada por la gran cantidad de investigaciones realizadas sobre la síntesis de hormonas esteroides por el

foliculo ovárico del porcino es variada y en ocasiones contradictoria, tal como es la estimulación con gonadotropina coriónica humana (hCG) cuya actividad biológica es muy similar a la de la hormona luteinizante (LH), es decir estimular el crecimiento y maduración folicular, sin embargo algunos trabajos reportan que ésta tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de estrógenos por parte de las células de la capa granulosa (1,7).

OBJETIVOS

General:

El presente trabajo se propone estudiar el metabolismo de esteroides exógenos en las células de la teca y de la granulosa del foliculo ovárico del porcino.

Particulares:

- 1.- Establecer si existen diferencias entre las células de la teca y de la granulosa en relación al metabolismo de esteroides exógenos radiomarcados.

- 2.- Identificar en que tipo de célula se lleva a cabo la síntesis de andrógenos, a partir de progestinas.

- 3.- Identificar en que tipo de célula se lleva a cabo la síntesis de estrógenos, a partir de testosterona y androstendiona.

- 4.- Estimar la distribución celular de las enzimas: 17α -hidroxilasa, 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/5,4-isomerasa y aromatasas, en el folículo preovulatorio del ovario de porcino.

- 5.- Observar si existen cambios en la actividad de las enzimas descritas anteriormente, durante el desarrollo del folículo preovulatorio.

HIPOTESIS

La técnica de seguimiento isotópico o metabolismo de esteroides radiomarcados permitirá aumentar la sensibilidad en la detección de las enzimas de la vía esteroidogénica y proporcionará un panorama más amplio sobre las vías esteroidogénicas, particulares a cada tipo de célula folicular.

MATERIAL Y METODOS

Obtención de las gónadas.- Los ovarios se obtuvieron de cerdas de aproximadamente 100 Kg de peso corporal, inmediatamente después de su sacrificio en el rastro de Villa Milpa Alta, D.F., y fueron transportados en Solución Salina Balanceada libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , (SSB; 0.154 M NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 2.7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , con rojo fenol como indicador de pH) en hielo, hasta el laboratorio para su procesamiento (23,31).

Disección de folículos.- Los folículos fueron disecados bajo observación con un microscopio estereoscópico y clasificados en folículos atrésicos y folículos no atrésicos o en desarrollo, por el método macroscópico descrito por Moor (22). Para este modelo experimental solo se trabajó con folículos preovulatorios no atrésicos y se formaron grupos de 2 a 4 folículos por tamaño: 4, 5, 6, y 8 mm de diámetro. No siempre los folículos procedieron del mismo ovario.

Separación de las capas foliculares.- Para separar las capas de la granulosa y de la teca interna se destinaron tres cajas de Petri para cada tamaño folicular, las cuales contenían previamente medio SSB. En la primera se cortó el folículo por la mitad para eliminar el líquido folicular; en la segunda cada mitad folicular fue evertida y por raspado suave de la pared interna del folículo con el filo de unas tijeras de disección

fue separada la capa granulosa; en la tercera, la teca interna se obtuvo por el mismo procedimiento de raspado. Se estimó que con esta técnica la contaminación de un tipo celular con el otro fue inferior al 10%, por lo que los resultados pueden ser mínimamente afectados (7,11).

Con el fin de concentrar las células de la capa granulosa, el medio en que estaban contenidas fue centrifugado a 800 rpm durante 10 minutos, al cabo de los cuales se decantó el líquido sobrenadante, y el botón celular se resuspendió en 500 μ l de medio de cultivo.

En los experimentos 1, 2, 3 y 4 se trabajó con las dos tecas foliculares, mientras que en los experimentos 5 y 6 solo se trabajó con la teca interna.

Disgregación de las células.- Para realizar la separación celular, las capas granulosa y tecal fueron puestas en matraces de 25 ml de capacidad a los que previamente se habían aplicado 5 ml de tripsina (Grand Island Biological Co. Grand Island, NY) a la concentración de 0.15 % en medio SSB, para llevar a cabo la digestión enzimática a una temperatura de 37°C en un incubador Dubnoff con rotación de 90 rpm, durante 5 y 15 minutos respectivamente, durante este tiempo los tejidos en tripsinización se pipetearon suavemente para facilitar la acción enzimática (23).

Al cumplirse el período asignado para la digestión enzimática, y por observación del medio de cultivo en que se incubaron los tejidos, el cual mostraba un aspecto turbio, se procedió a

aplicar 5 ml de inhibidor de tripsina (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO) al 0.3 % en medio SSB para detener la digestión enzimática (23,31).

Para separar el tejido conjuntivo de las células foliculares, el medio en que estaban contenidas se pasó a través de un cedazo de nylon y se centrifugó a 800 rpm x 10 min. Se decantó el líquido sobrenadante, se resuspendió el botón celular en 5 ml de medio de cultivo nuevo, se centrifugó por segunda ocasión para lavar las células. El botón celular se resuspendió en 500 μ l de medio Dulbecco-Albúmina bovina al 0.1% (Grand Island Biological Co. Grand Island, NY) y se procedió a establecer la cantidad de células contenidas en el medio de cultivo (23,31).

Conteo celular.- En un tubo de ensayo se aplicaron 20 μ l de medio Dulbecco más 80 μ l del colorante azul de tripán y 20 μ l de la suspensión celular; se mezclaron por pipeteo suave, y se tomaron 20 μ l de la mezcla final que se aplicaron en las cámaras del hematocitómetro. Se lleva al microscopio para realizar el conteo de las células contenidas en el medio de cultivo Dulbecco. La viabilidad de las células se estableció por el método de exclusión del azul de tripán (27).

Como control de la correcta separación de las capas tecal y granulosa, se procesaron para histología muestras de pared folicular intacta y muestras de pared folicular después de haberle separado la capa de la granulosa.

Metabolismo de Esteroides.- Las suspensiones de células viables

(equivalente a 5×10^5 cels.) fueron incubadas en viales (Liquid scintillation vials; Wheaton Scientific Millville, NJ) de 20 ml de capacidad que contenían medio de cultivo Dulbecco-Albúmina bovina en presencia de 1 mg/ml de hCG (excepto en una muestra de granulosa de 6mm de diámetro (G_6) del experimento 5 y una muestra de granulosa de 4mm de diámetro (G_4) en el experimento 6) y Xantinas 0.1% (excepto en los experimentos 2, 3, 4 y 5) en un volumen final de 1000 μ l.

Para estudiar el metabolismo de esteroides, a cada cultivo celular se aplicó 0.1 μ Ci de cualquiera de los siguientes precursores radiomarcados, en un volumen de 10 μ l de etanol absoluto (Merck; México, DF):

- pregnenolona, [7- 3 H(N)]-Pregnenolone (25.0 Ci/mmol).
- dehidroepiandrosterona, [1,2- 3 H(N)]-dehidroepiandrosterone (58.6 Ci/mmol).
- androstendiona, [1,2,6,7- 3 H(N)]-androstenedione (93.0 Ci/mmol).
- testosterona, [1,2,6,7- 3 H(N)]-testosterone (93.9 Ci/mmol).

Todos los esteroides radiactivos fueron adquiridos de New England Nuclear (Boston, MA).

En total se realizaron 6 experimentos: en los experimentos 1, 2 y 3 se aplicaron los precursores dehidroepiandrosterona y androstendiona, en tanto que en los experimentos 4 y 6 se aplicó pregnenolona y testosterona, mientras que en el experimento 5 se aplicaron pregnenolona, dehidroepiandroste-

rona y testosterona.

La incubación se realizó bajo una atmósfera de aire:CO₂ (95:5%), a 37°C durante 60 minutos, (excepto dos muestras de granulosa de folículos de 6 mm de diámetro, en el experimento 6 (G₆), que se incubó por 120 min). Al término del tiempo de incubación se aplicó al cultivo 10 ml de éter etílico, para detener el metabolismo.

Extracción de los esteroides.- Las muestras se agitaron en un agitador mecánico durante 30 segundos y se congelaron a -40°C hasta su posterior análisis para determinar los esteroides producidos. Las muestras congeladas están formadas por dos fases bien identificables, la fase congelada o acuosa que se encuentra al fondo del vial en estado físico sólido y de color blanco, y la fase no congelada o etérea que se observa como un líquido transparente. La fase etérea se decantó en un vial previamente identificado y se evaporó a sequedad a 37°C. A la fase acuosa se le aplicó 10 ml de éter etílico, se agitó en un agitador mecánico durante 45 segundos, se congeló en acetona con hielo seco, enseguida la fase etérea se decantó en el vial correspondiente y se congeló por tercera vez para repetir el proceso, completando un total de 30 volúmenes (23).

Separación e identificación de los metabolitos.- En una placa de silicagel para cromatografía en capa fina, (Cromatofolios AL de silicagel 60F₂₄, para cromatografía en capa fina 20 x 20 cm. y espesor de capa de 0.2 mm., Merck, México) se realizó un

rallado para formar 12 carriles de 1.5 cm y dos márgenes laterales de 1 cm., perpendicular a esto se trazó una línea a 2.5 cm. de un borde, lo que fue el punto de aplicación, y se trazó otra línea a 2.0 cm. del borde contrario, que fue el frente del solvente.

Los estándares auténticos de esteroides se aplicaron en los dos primeros y los dos últimos carriles de la placa de silicagel, en una cantidad aproximada de 2-10 μg disueltos en etanol absoluto. Los estándares utilizados fueron: Pregnenolona (P_1), 17 α -hidroxi-pregnenolona (17OH- P_1), progesterona (P_2), 17 α -hidroxi-progesterona (17OH- P_2), 20 α -dihidro-progesterona (20 α -DHP), dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenediona (A_1), testosterona (T), 17 β -estradiol (E_2), estrona (E_1), 5 α -androstan-3 α -ol-17-one, 5 α -androstan-3 β -ol-17-one (3 β -ol-17-ona-5 α A), 5 α -androstan-3 α -17 β -diol, 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol (3 β ,17 β -5 α -Adiol), 5 β -androstan-17 β -ol-3-one, 5 β -androstan-3 α -17 β -diol, 5-androsten-3 β ,17 β -diol y sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S), los cuales fueron obtenidos de Steraloids, Inc. (Wilton, NH). Los estándares se sembraron con tubos capilares de vidrio en la línea de aplicación. En los carriles centrales (3-10), previo a la aplicación de la muestra radiactiva, se incluyeron cada uno de los estándares auténticos en el mismo punto de aplicación, para que funcionaran como acarreadores.

Cuando se estudió el metabolismo de andrógenos (DHEA, T y A_1) se utilizaron los siguientes estándares auténticos: DHEA, DHEA-S, A_1 , T, E_2 y E_1 , así como los andrógenos 5 α - y 5 β -reducidos.

En el caso del metabolismo de la pregnenolona se incluyeron los estándares P₃, P₄, 17 α -OH-P₃, 17 α -OH-P₄, 20 α -DHP, A₄, T y E₁.

El criterio para determinar que estándares auténticos se aplicaron en cada experimento se estableció por los metabolitos esperados a partir de los precursores radiomarcados.

Los esteroides contenidos en el extracto etéreo se resuspendieron en 100 μ l de etanol absoluto y se aplicaron 50 μ l de cada muestra en uno de los carriles centrales (3-10) de la placa de silicagel, acelerando el secado con una corriente suave de gas nitrógeno, que a la vez evita que los esteroides sufran oxidación. Una vez que se han aplicado las 8 muestras en cada placa, se preparó la cámara para cromatografía (Gelman, modelo 51325-1) con el sistema de solventes diclorometano: acetato de etilo (80:20, v/v) (solventes de grado analítico, Merck), la placa se colocó dentro de la cámara, y se selló herméticamente. En éste momento empezó a correr la cromatografía, la cual terminó cuando la migración de la mezcla de solventes tocó la línea colocada a 2 cm. del borde superior. La placa se sacó de la cámara de cromatografía, se dejó secar y se observó bajo una lámpara de luz ultravioleta, donde se localizaron los esteroides visibles a este tipo de luz, (e.g., androstenediona +++++, testosterona +++, 20 α DHP+, 17 α -OH-P₄+ E₂+ y E₁+), los que se marcaron con un lápiz de punta suave. Posteriormente se cortó el área de los carriles que contiene sólo a los esteroides auténticos (1, 2 y 11, 12) y se rociaron con la mezcla ácido sulfúrico:agua (1:1, v/v), se colocaron en una platina caliente a 100°C para revelar las áreas donde

migraron los estándares auténticos que no son visibles a la luz ultravioleta, y se revelaron como manchas de distintos colores, a diferentes niveles de migración mismos que ayudan a determinar de que esteroide se trata. También se hacen visibles los esteroides marcados con la ayuda de la luz ultravioleta.

Se alinearon los trozos de la placa en los sitios de donde fueron cortados y se efectuó un rallado que ubica la migración de los estándares auténticos, formándose un cuadrículado con los carriles marcados previamente. Cada carril quedó dividido en 12-14 fracciones.

Cada carril fue separado del resto de la placa y cortado en rectángulos que contenían a los esteroides separados. Cada fracción se colocó dentro de un vial en el orden en que fueron cortados. Se aplicó 5 ml de líquido de centelleo (Dimetil-POPOP 0.02 % , PPO 0.4 % , Tolueno:Tritón X-100 (2:1, v/v); Sigma, St. Louis, MO) a cada vial, se le identificó en la tapa, y se colocó en un espectrofotómetro de centelleo líquido (Beckman LS6000), que estableció cuanta radiactividad se encontró en cada fracción del carril contenido. El parámetro utilizado para determinar la radiactividad en este experimento fue el de cuentas por minuto (cpm).

Se efectuó una suma de las radiaciones emanadas de un solo carril y se determinó que porcentaje correspondió a cada fracción. Debido a que la mayoría de las muestras se realizó por duplicado, se obtuvo un promedio entre las dos muestras, al que se le restó el resultado de una muestra "blanco" que correspondía solo medio de cultivo más el esteroide radiomarcado,

con la finalidad de descartar la posible desintegración espontánea del esteroide radiomarcado durante la incubación.

RESULTADOS**Metabolismo de la pregnenolona**

Los principales metabolitos de la pregnenolona fueron progesterona y testosterona, aunque también se detectaron pequeñas cantidades de DHEA, A4, 17OH-P5, y un metabolito desconocido, que migra de manera similar a la forma sulfatada de DHEA (DHEA-S), es decir, en el punto de aplicación, Cuadro 1.

Células de la Granulosa

La pregnenolona fue escasamente metabolizada por las células de la granulosa de todos los tamaños foliculares. Aunque hubo transformación hacia 17-OH-pregnenolona, progesterona, dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenediona (A4), y el compuesto similar a DHEA-S, ninguno de éstos se acumuló en más del 2%, Cuadro 1.

Células de la Teca

El metabolismo de la pregnenolona fue más activo en las células de la teca en comparación con las células de la granulosa, Cuadro 1.

Uno de los principales metabolitos, la progesterona, fue acumulado por las células de la teca de todos los tamaños foliculares.

Se detectó la presencia de 17OH-P5 en casi todos los folículos, sin encontrarse relación entre su acumulación con el tamaño

folicular.

En algunos folículos se detectaron menores cantidades de DHEA y A4,

CUADRO 1: Metabolismo de pregnenolona por células de la granulosa y células de la teca de folículos de diferentes tamaños.

#exp	T.cel.	#cels.	p.apl.	17OHP5	T	DHEA	P5	A4	P4
4	CG4	561	0.03	0.03	--	0.73	92.00	--	0.64
5	CG4	546	--	--	--	--	94.55	--	--
6	CG4	491	0.21	0.14	--	--	95.03	--	--
6	CG5	504	0.33	0.62	--	--	94.10	--	0.99
4	CG6	546	--	--	--	--	93.39	0.04	0.53
5	CG6	507	--	0.02	0.17	--	90.12	1.54	--
6	CG6	606	0.31	1.01	--	--	92.50	--	0.04
4	CG8	584	0.05	--	0.48	1.05	91.24	--	0.23
4	CT4	504	1.27	1.98	15.13	1.69	47.22	3.78	17.21
5	CT4	435	3.93	5.05	19.60	--	46.20	7.30	10.10
6	CT4	260	0.52	6.57	0.88	--	70.59	--	13.90
6	CT5	511	1.07	10.84	3.59	--	65.66	--	8.62
4	CT6	511	1.33	--	12.04	2.14	55.53	2.87	15.30
5	CT6	360	4.00	2.49	17.56	--	54.15	9.05	5.12
6	CT6	150	0.34	1.88	0.10	--	88.21	--	4.16
4	CT8	504	4.13	6.82	11.79	10.32	32.53	11.17	12.20

Donde "CG", células de la granulosa; "CT", células de la teca. El número adyacente a "CG" y "CT" es el tamaño folicular (en mm); #exp., número de experimento; T.cel., tipo celular; #cel., número de células (x 1000); p.apl., punto de aplicación; 17OHP5, 17 α -hidroxi-pregnenolona; T, testosterona; DHEA, dehidroepiandrosterona; P5, pregnenolona; A4, androstendiona; P4, progesterona.

que aumentaron conforme el folículo fue de mayor tamaño. Otro de los metabolitos que se observó en mayores cantidades fue la testosterona, con mayor acumulación en los folículos de 4 mm de diámetro en relación con los de 6 y 8 mm. También se detectó el metabolito desconocido que migra similar a DHEA-S, sin encontrarse relación entre la acumulación de éste y el tamaño folicular.

Metabolismo de la dehidroepiandrosterona

En todos los folículos analizados los principales metabolitos de la dehidroepiandrosterona (DHEA) fueron: A4, T, 3 β ,17 β -5 α -Adiol, E₂ y E₁, Cuadro 2.

Células de la Granulosa

En estas células, independientemente del tamaño folicular, el principal metabolito de la DHEA fue la testosterona. Aunque no se observó relación entre su acumulación con el tamaño folicular, su producción fue mayor en los cultivos que fueron adicionados con xantinas. En algunos cultivos se sintetizó el metabolito 3 β ,17 β -5 α -Adiol, sin encontrarse relación alguna entre su producción con el tamaño folicular. Otro de los metabolitos observados fue A4, siendo su acumulación máxima en las células de la granulosa procedentes de folículos de 8 mm incubadas en ausencia de xantinas.

La detección de pequeñas cantidades de estradiol en algunos experimentos fue mayor cuando las xantinas estuvieron presentes

en el medio de cultivo. La producción de estrona fue escasa y sólo se observó en dos experimentos.

Por otro lado, se detectaron cantidades variables del metabolito que migra similar a DHEA-S, Cuadro 2.

Células de la Teca

El principal metabolito de la dehidroepiandrosterona en las células de la teca fue la androstendiona, con una producción inversa al tamaño folicular.

Otro metabolito presente en porcentajes variables fue la testosterona, que se incrementó ligeramente en los cultivos adicionados con xantinas.

Los estrógenos, 17 β -estradiol y estrona, se detectaron en algunos experimentos. La mayor acumulación de éstos se observó en los cultivos de 8mm. que fueron adicionados con xantinas.

El metabolito 3 β ,17 β -5 α -Adiol fue detectable en solo 2 experimentos. En tanto que el metabolito similar a DHEA-S se presentó en cantidades variables, pero principalmente en las tecas de folículos grandes incubados en presencia de xantinas, Cuadro 2.

Cuadro 2. Metabolismo de dehidroepiandrosterona por células de la teca y células de la granulosa de folículos de diferentes tamaños.

3 β ,17 β -									
#exp.	T. cel.	#cel.	p.apl.	5 α -Adiol	T	DHEA	E2	A4	E1

1	CG4	448	1.08	--	27.83	60.17	0.42	--	--
2	CG4	478	0.55	14.68	8.98	69.49	--	0.38	0.11
3	CG4	498	2.35	2.67	22.40	62.01	--	0.44	--
5	CG4	524	14.14	--	10.47	69.48	--	--	--
2	CG6	516	--	4.06	2.88	83.30	--	--	--
3	CG6	593	5.76	--	19.28	46.26	2.15	16.98	--
5	CG6	507	6.60	--	12.49	66.42	--	0.11	--
1	CG8	504	1.10	--	26.26	54.41	7.95	1.36	--
3	CG8	512	10.01	0.60	1.44	21.33	0.45	50.93	1.34

1	CT4	444	4.31	--	2.32	2.25	--	84.59	0.39
2	CT4	475	2.01	0.26	0.86	6.58	--	82.84	0.19
3	CT4	188	3.73	--	0.81	19.53	0.52	67.57	--
2	CT6	520	1.45	0.32	0.40	20.22	--	67.69	--
3	CT6	180	1.83	--	2.03	37.21	3.87	46.15	--
1	CT8	528	30.88	--	7.07	3.83	5.68	24.54	8.37
3	CT8	134	0.68	--	0.23	9.40	--	74.59	--

Donde "CG", células de la granulosa; "CT", células de la teca. El número adyacente a "CG" y "CT" es el tamaño folicular (en mm); #exp., número de experimento; T. cel., Tipo celular; #cel., número de células (x 1000); p.apl., punto de aplicación; T, testosterona; DHEA, dehidroepiandrosterona; E2, 17 β -estradiol; A4, androstenediona; E1, estrona; 3 β ,17 β -5 α -Adiol, 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol. En el experimento número 1 las células se incubaron en presencia de xantinas.

Metabolismo de la androstendiona

Los principales metabolitos de la androstendiona fueron: testosterona (T), 17 β -estradiol (E2), estrona (E1), 3 β ,17 β -5 α -Adiol, y el compuesto desconocido, similar a DHEA-S, Cuadro 3.

Células de la Granulosa

La producción de estrógenos por células de la granulosa de folículos de 4 mm de diámetro fue mayor cuando se incubaron en presencia de xantinas (exp. 1), en contraste a la observada en ausencia de xantinas (exp. 2 y 3). Sin embargo, la acumulación de T no pareció afectarse de manera importante por la presencia de xantinas, pero sí aumento la acumulación del metabolito similar a DHEA-S. Por otra parte, en presencia de xantinas no se produjo el 3 β ,17 β -5 α -Adiol, independientemente del tamaño folicular analizado y del tipo celular.

En folículos de 8 mm de diámetro, las células de la granulosa mostraron una mayor acumulación del compuesto similar a DHEA-S y de estrógenos, cuando se incubaron en presencia de xantinas, en comparación con los folículos de 4 mm.

En casi todos los folículos analizados se detectó la presencia del metabolito 5 α -Androstan-3 β -ol-17-ona (3 β -ol-17-ona-5 α A), sin observarse relación alguna con la presencia de xantinas o con el tamaño folicular.

Cuadro 3. Metabolismo de androstendiona por células de la teca y células de la granulosa de folículos de diferentes tamaños.

#exp.	T.cel.	#cel.	p.apl.	3 β ,17 β -		3 β -ol-17-ona		A4	E1
				5 α -Adiol	T	5 α -A	E2		
1	CG4	448	16.37	--	1.87	1.34	10.17	59.81	2.25
2	CG4	478	11.10	0.44	1.19	0.81	1.93	70.87	1.10
3	CG4	498	19.10	2.85	1.58	5.39	--	70.92	0.94
2	CG6	516	1.87	0.09	0.24	--	--	87.11	0.86
3	CG6	593	9.42	4.67	1.74	3.03	2.02	66.92	1.59
1	CG8	504	31.50	--	2.61	0.98	21.55	21.88	8.68
3	CG8	512	1.94	1.74	0.74	2.26	--	83.89	0.33
1	CT4	444	4.31	--	0.54	--	1.42	84.93	0.86
2	CT4	475	0.53	0.04	0.05	--	--	90.14	1.50
3	CT4	188	0.25	--	0.14	0.99	--	89.95	0.17
2	CT6	260	0.01	0.03	--	--	1.93	86.18	0.50
3	CT6	180	0.12	0.44	0.17	0.39	--	89.81	0.21
1	CT8	528	33.14	--	2.58	0.48	20.40	22.24	5.71
3	CT8	134	--	--	--	0.35	0.11	89.98	0.14

Donde "CG", células de la granulosa; "CT", células de la teca. El número adyacente a "CG" y "CT" es el tamaño folicular en (mm); #exp., número de experimento; T. cel., Tipo celular; #cel., número de células (x 1000); p.apl., punto de aplicación; 3 β ,17 β -5 α -Adiol, 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol; T, testosterona; 3 β -ol-17-ona-5 α -A, 5 α -androstan-3 β -ol-17-ona; E2, 17 β -estradiol; A4, androstenediona; E1, estrona. En el experimento 1 las células se incubaron en presencia de xantinas.

Células de la Teca

Las células de la teca de todos los tamaños foliculares estudiados mostraron poco metabolismo de androstendiona, cuando se incubaron en ausencia de xantinas. Entre los metabolitos detectados bajo estas condiciones solamente la estrona y.

ocasionalmente el 17β -estradiol se produjeron en mayor cantidad, pero en ningún caso ésta fue superior al 2 %.

En contraste, las células de la teca que fueron incubadas en presencia de xantinas metabolizaron más activamente a la androsterodiona, siendo los principales metabolitos el compuesto similar a DHEA-S, 17β -estradiol, estrona y testosterona.

La producción de los estrógenos ($E_1 + E_2$) fue mayor en las células de la granulosa en relación a las células de la teca.

Metabolismo de la testosterona

Cuando la testosterona fue utilizada como sustrato, los principales metabolitos observados fueron: $3\beta,17\beta-5\alpha$ -Adiol, E_2 , A_4 , E_1 y el compuesto similar a DHEA-S.

Células de la Granulosa

Las células de la granulosa mostraron poco metabolismo de la testosterona. La producción de metabolito similar a DHEA-S fue mayor que la de los demás metabolitos, la cual incrementó en relación al tamaño folicular y a la ausencia de hCG, Cuadro 4.

Células de la Teca

Las células de la teca metabolizaron mínimamente la testosterona. Solo en la teca de los folículos de mayor tamaño se observó una producción significativa del compuesto similar a DHEA-S y menores proporciones de $3\beta,17\beta-5\alpha$ -Adiol y E_2 , Cuadro

Cuadro 4. Metabolismo de testosterona por células de la teca y células de la granulosa de folículos de diferentes tamaños.

#exp.	T.cel.	#cel.	p.apl.	3 β ,17 β -				
				5 α -Adiol	T	E2	A4	E1
4	CG4	561	0.74	--	91.02	--	0.15	0.12
5	CG4	524	4.98	2.46	84.16	0.43	0.05	--
6	CG4	507	0.71	0.09	86.43	0.12	0.25	--
6	CG4 ¹	507	11.35	0.51	73.17	0.85	0.14	2.37
6	CG5	504	6.23	6.82	77.05	0.17	0.18	--
4	CG6	546	3.75	3.85	91.05	0.27	0.42	0.33
5	CG6	507	12.69	2.73	74.66	1.20	0.17	0.36
5	CG6 ¹	507	16.30	1.24	71.96	1.67	0.21	0.33
6	CG6	606	7.84	0.56	78.10	0.67	0.02	0.52
6	CG6 ²	606	9.94	10.11	68.86	1.21	--	--
6	CG6 ³	606	20.46	5.69	63.31	2.89	--	0.66
4	CG8	584	28.72	4.40	57.16	3.12	0.07	0.08
4	CT4	504	0.28	--	91.99	--	0.07	0.08
4	CT6	501	--	1.69	91.38	--	0.21	0.25
4	CT8	504	12.98	2.87	77.59	1.03	0.33	0.19

Donde "CG", células de la granulosa; "CT", células de la teca. El número adyacente a "CG" y "CT" es el tamaño folicular en (mm); #exp., número de experimento; T. cel., Tipo celular; #cel., número de células (x 1000); p.apl., punto de aplicación; 3 β ,17 β -5 α -Adiol, 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol; T, testosterona; E2, 17 β -estradiol; A4, androstenediona; E1, estrona. Superíndices: "1", Sin hCG; "2", Con xantinas y hCG; "3", Con xantinas y hCG e incubando por 2 horas

DISCUSION

Obtención de las suspensiones celulares de folículos en desarrollo

Entre los procedimientos disponibles para identificar folículos en desarrollo y folículos atresicos, se ha sugerido que el método macroscópico descrito por Moor para ovinos (21) es aplicable también para diferenciar a los folículos del porcino, con una efectividad del 95% (14). Con este procedimiento se pudo distinguir a los folículos preovulatorios por la abundante irrigación de la teca interna y por la pared folicular transparente, en tanto que los folículos atresicos se mostraron pálidos y su pared folicular opaca.

La separación de las capas celulares, teca y granulosa, por el procedimiento de raspado, ha sido empleado con efectividad por diversos investigadores, (7,11); sin embargo, en el presente trabajo existe la posibilidad de contaminación de un tipo celular con el otro, lo cual hemos estimado en un 10 % con base en sus características microscópicas. Este porcentaje se encuentra dentro de los rangos manejados por otros investigadores y se considera que no afecta los resultados significativamente.

La viabilidad de las células al término del período de incubación, evaluada por la exclusión del azul de tripano (27), se mantuvo en un rango de 85-90 %, lo cual es apoyado por los resultados del metabolismo del precursor radiomarcado hacia otros metabolitos de la vía esteroidogénica tanto a los 60 como

a los 120 minutos de incubación.

Aunque la extracción de los esteroides con éter etílico se considera adecuada cuando se realiza con 20 volúmenes, en el presente trabajo la extracción se efectuó con 30 volúmenes, para asegurar su eficiencia. Sin embargo, cuando se utilizó androstendiona o testosterona como sustrato, no se logró una completa extracción, permaneciendo aproximadamente un 10% de la radiactividad en la fase acuosa. Este fenómeno también ha sido observado por algunos investigadores, los que sugieren que se trata del ácido androstanoico que, debido a su alta polaridad no es posible extraerlo con solventes (11).

Metabolismo de esteroides exógenos radiomarcados

La separación e identificación de los metabolitos por el método de cromatografía en capa delgada permitió aumentar el número de metabolitos identificados a partir de un precursor dado, y también detectar la presencia de metabolitos no identificados o desconocidos, en comparación al uso del RIA, donde sólo se pueden evaluar los metabolitos para los que se tienen anticuerpos.

La sensibilidad del método utilizado permite detectar metabolitos en porcentajes menores al 1% de transformación (i.e., 100 fmol que son diferentes a 1 pmol en el RIA), lo que hace al método 10 veces más sensible con base en la alta actividad específica del precursor (sp. act. mCi/mmol).

La recuperación de la radiactividad aplicada al medio de incubación se mantuvo en un rango de 88-95% .

Actividad de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/delta 5-4 isomerasa (3 β -HSD)

La presencia de la enzima 3 β -HSD en las células estudiadas fue inferida por su actividad enzimática al transformar P5 en P4 y DHEA en A4. Estudios posteriores podrán mostrar las propiedades cinéticas de las enzimas detectadas.

Con P5 las células de la granulosa mostraron una baja actividad de 3 β -HSD, en tanto que en las células de la teca fue mayor la actividad enzimática, la cual varió en proporción inversa con el tamaño folicular.

El hecho de observar mayor actividad de la 3 β -HSD en las células de la teca, apoya la hipótesis de que éste es el sitio de producción de los andrógenos aromatizables. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con los reportados por Evans, quién mostró que la mayor acumulación de progesterona se realiza en la capa granulosa en relación con la teca, cuando las células fueron incubadas sin sustrato exógeno (7). La discrepancia en estos resultados tal vez esté relacionada con el tiempo de incubación empleado en cada trabajo, en el presente fue de 1 hora, en tanto que en el de Evans fue de 24 horas, lo que podría implicar la luteinización *in vitro* de las células granulosas (11) o bien, que tenga que ver con la maduración *in vitro* de las células foliculares (16).

Con DHEA, las células de la granulosa manifestaron mayor actividad de 3 β -HSD que cuando se utilizó P5 como sustrato, pero fue menor que la observada en la teca de folículos de todos los tamaños, en donde se acumuló el mayor porcentaje de

A4.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Ainsworth (1) y por Evans (7) en el sentido de que el principal andrógeno producido por el folículo ovárico porcino es la androstendiona. Dado que la expresión enzimática de la 3 β -HSD a partir de P5 fue mucho menor en las células de la granulosa que en células de la teca y que la actividad enzimática de la 3 β -HSD a partir de DHEA fue menor en las células de la granulosa, se puede concluir que esta enzima se encuentra principalmente en las células tecales y en menor proporción en las células granulosas, por lo menos al principio del cultivo *in vitro*. Por otro lado, la actividad enzimática de la 3 β -HSD aparentemente fue mayor en los folículos de 4 mm que en los de 8 mm lo que podría sugerir una diferencia debida a la madurez del folículo (16).

El hecho que la actividad enzimática de la 3 β -HSD fuera mayor con la dehidroepiandrosterona que con la pregnenolona puede significar que ésta tiene una mayor afinidad por la DHEA, aunque también puede deberse a la presencia de isoenzimas con diferente especificidad por sustrato, lo que permitiría formas alternativas de regulación.

Actividad de la enzima 17 α -hidroxilasa (P450c17)

Esta enzima cataliza dos importantes reacciones sobre las progestinas pregnenolona y progesterona, primero, su 17 α -hidroxilación, y segundo, la separación de la cadena lateral a nivel de C17-C20, pasos esenciales para la biosíntesis de los

andrógenos dehidroepiandrosterona y androstendiona, respectivamente (12,17).

En células de la granulosa se detectó pobre actividad de esta enzima. Por el contrario, en las células de la teca se detectó la mayor actividad enzimática, con acumulación de 17α -hidroxi-pregnenolona en casi todas las células procedentes de los diferentes tamaños foliculares empleados. También se detectaron cantidades variables de dehidroepiandrosterona y de androstendiona en algunos experimentos.

De manera similar, encontramos que la progesterona pasa a androstendiona en cantidades variables en algunos experimentos, principalmente en las células de la teca.

En ambos tipos celulares, la detección de dehidroepiandrosterona y androstendiona, a partir de pregnenolona, proporciona una evidencia indirecta de la acción de esta enzima. No hubo relación entre su actividad con el tamaño folicular.

Evalrados en conjunto, los resultados anteriores pueden ser interpretados en el sentido de que la teca es el sitio principal de producción de los andrógenos metabolizables (i.e., mayor actividad de P450c17 y de 3 β -HSD). Y son apoyados por lo reportado por Hanukoglu (17) que ubica la presencia del P450c17 preferentemente en la teca interna y, específicamente para el porcino por lo reportado por Lischinsky (20) que menciona que la granulosa es incapaz de sintetizar andrógenos a partir de progestinas.

Actividad de la enzima 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD)

La enzima 17 β -HSD también es conocida con 17ceto-esteroide reductasa, cataliza la conversión reversible de los grupos 17ceto- y 17 β -OH tanto en los andrógenos metabolizables como en los estrógenos (12,17).

Para detectar la actividad de esta enzima se emplearon los sustratos androstendiona y testosterona, aunque desde el empleo de la dehidroepiandrosterona se le pudo detectar.

En células granulosas la presencia de testosterona a partir de DHEA fue abundante pero heterogénea en todos los tamaños foliculares, siendo característico que los más altos valores se encontraran en los cultivos adicionados con xantinas, lo que podría indicar una clara presencia de la enzima 17 β -HSD actuando sobre la androstendiona formada. En cambio, cuando la androstendiona fue utilizada como sustrato, su transformación en testosterona fue baja. La acción de la 17 β -HSD sobre la testosterona fue casi indetectable.

En el compartimiento tecal la detección de testosterona a partir de DHEA y de A4 fue mucho menor que en la granulosa y la reacción inversa fue apenas detectable. Al porcentaje específico de testosterona detectada, debe sumarse el porcentaje de 17 β -estradiol producido, ya que éste representa el siguiente paso en la vía esteroideogénica y también uno de los sustratos de la 17 β -HSD.

Con estas consideraciones, parece que el sentido preferente de la 17 β -HSD es de androstendiona hacia testosterona y no viceversa.

La baja actividad detectada de la 17 β -HSD a partir de la androstendiona concuerda con lo reportado por Garrett (11), quién en cultivos de células de granulosa durante 12 h observó una transformación de androstendiona en testosterona en un porcentaje de 6.5 %, en tanto que en el presente trabajo, los porcentajes fueron menores a 3 y 1 para granulosa y teca, respectivamente, en cultivos de 1 y 2 horas. Estos resultados coinciden con la hipótesis propuesta por Evans (7) en el sentido de que la teca folicular del porcino es relativamente baja en la actividad de la 17 β -HSD, pero no en la parte que afirma que la granulosa puede convertir rápidamente androstendiona en testosterona.

Actividad de Aromatasa (P450arom)

La expresión de la actividad de la enzima aromatasa se detectó a partir de los precursores androstendiona y testosterona, que producen estrona (E₁) y 17 β -estradiol (E₂), respectivamente (12,17).

En células de la granulosa, la androstendiona se metabolizó hacia estrona (E₁), con mayor producción cuando el cultivo se realizó en presencia de xantinas, sin mostrar influencia por el tamaño folicular. La detección de 17 β -estradiol (E₂) se realizó principalmente en las células que se incubaron en presencia de xantinas, en cambio, en los cultivos celulares carentes de éstas, la detección fue muy baja o no se detectó. Los resultados anteriores pueden sugerir un papel funcional del adenosin-monofosfato cíclico (cAMP) como mensajero secundario

en la regulación de la actividad de la 17 β -HSD.

En células de la granulosa incubadas con testosterona se observó una débil expresión de la enzima aromatasa, con producción de E₂ y de E₁. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Garrett (11) respecto a la baja producción de estrógenos, el cual mostró que además de una mínima acumulación de E₂, el principal metabolito encontrado fue la 19-hidroxi-testosterona (11), la cual no pudo ser identificada en el presente trabajo.

En células de la teca folicular. La androstendiona se metabolizó en mayor proporción hacia E₂ que hacia E₁, aunque de éste último se detectaron pequeñas cantidades en todos los experimentos. En los experimentos adicionados con xantinas al medio de incubación, la producción de estrógenos por células de la teca de los folículos de 8 mm fue mayor que en las células de la teca de 4 mm.

En los demás experimentos la actividad de aromatasa se mantuvo baja o no se detectó.

En células de la teca incubadas con testosterona, la actividad de aromatasa se manifestó por producción de E₂ en un experimento y por producción de E₁ en todos los realizados.

La actividad de aromatasa se detectó principalmente en cultivos celulares de la capa granulosa y en menores cantidades en la teca, con mayor acumulación de E₂ que de E₁, aunque de éste último, en la granulosa y la teca se detectaron cantidades pequeñas en todos los experimentos, no así el caso con el estradiol que proporcionó cantidades muy altas en algunos

experimentos, principalmente en los cultivos adicionados con xantinas en tanto que en otros experimentos no se detectó.

La actividad de la enzima aromatasa se manifiesta mejor cuando el substrato aromatizable es androstenediona que cuando se utiliza testosterona, ya que la cantidad de estrógenos producidos por la incubación con A4 es mayor que con T, así mismo, el substrato remanente es menor en el caso de A4 que en el de T. De donde se deduce que el substrato preferido por la aromatasa en células granulosas es A4.

La producción de los estrógenos es mayor en los folículos de mayor tamaño y con la adición de xantinas al medio de cultivo. Estos resultados concuerdan con los reportados por Evans, (7) que sin estimulación por gonadotropinas *in vivo* en cultivos celulares de 24 h de duración con y sin adición de gonadotropinas al medio de cultivo encontró mayor producción de estradiol en granulosa que en teca. También, los resultados que reportan Haney and Schomberg (16) al cultivar células de la granulosa y de la teca con testosterona como substrato aromatizable reportaron mayor producción de estrógenos en células granulosas que en células de la teca. En los experimentos anteriores también se detectaron cantidades crecientes de estrógenos conforme aumenta el tamaño folicular.

Metabolismo reductivo de los andrógenos

La reducción enzimática de los andrógenos se presenta en el ovario de varias especies. Las enzimas que catalizan esta reducción son estereo-específicas para las posiciones 5 α - ó 5 β y se localizan en el retículo endoplásmico liso. En algunos

sistemas ováricos estudiados, la reductasa es específica para la configuración 5α -, aunque se han identificado metabolitos 5β -reducidos en ovarios de hámster (12).

En el presente trabajo se detectaron, en algunos experimentos, diferentes cantidades de un metabolito que migra en la misma posición del 5α -androstan- $3\beta,17\beta$ -diol cuando el precursor radiomarcado es la dehidroepiandrosterona, la androstendiona o la testosterona, con mayor acumulación en granulosa que en teca.

En presencia de androstendiona, en algunos experimentos, también se detectaron diferentes cantidades de un metabolito que migra en la zona donde lo hace el estándar auténtico del 5α -androstan- 3β -ol- 17 -ona con mayor acumulación en células de granulosa que en teca.

En general, los resultados anteriores sugieren un mayor metabolismo de los esteroides 5α -reducidos en las células de la granulosa.

Estos resultados difieren con los reportados por Garrett (11) quién no detectó ningún esteroide 5α -reducido por el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución en células de la granulosa. La discrepancia entre estos resultados puede deberse al diferente período de incubación o al medio de cultivo empleado.

Metabolito Desconocido

En el punto de aplicación de la placa para cromatografía en capa fina se detectaron cantidades variables de un metabolito que migra de manera similar a como lo hace la forma

sulfatada de la dehidroepiandrosterona, es decir, no migra del punto de aplicación.

La presencia de esteroides sulfatados en el porcino ya ha sido reportada por Lischinsky (20) para los andrógenos en células de la granulosa y por Garrett (11) para los estrógenos durante la luteinización de estas células.

En células de la granulosa, en cultivo con pregnenolona, dicho metabolito se detectó en cantidades del 0.3% o menores, en tanto en células de la teca las cantidades detectadas fueron del orden del 0.5 al 4%.

En los cultivos con dehidroepiandrosterona, en la granulosa, los porcentajes de detección de este metabolito, fueron en promedio de 4.62%, mientras que en la teca, el promedio fue de 6.41%.

En los cultivos con androstendiona, en células de la granulosa, la acumulación promedio del metabolito desconocido fue de 9.73%, con mayor acumulación cuando el cultivo celular se hizo en presencia de xantinas. En la teca la acumulación promedio fue de 6.39%.

En los experimentos con testosterona, en células de la granulosa, la acumulación promedio del metabolito desconocido fue de 9.0%, en tanto que en la teca fue de 4.42%.

Cuando los precursores son P5 o DHEA, este metabolito, que probablemente sea un esteroide sulfatado, se produce más en las células de la teca que en las de granulosa; sin embargo, los porcentajes son relativamente bajos.

Con los andrógenos androstenediona y testosterona, la predominancia del posible esteroide sulfatado se invierte en la

granulosa y en la teca y además los porcentajes de acumulación aumentan ligeramente.

Independientemente del precursor empleado para el cultivo celular, la adición de xantinas dispara los porcentajes de producción de este posible esteroide sulfatado hasta por encima del 30% en granulosa y teca de los folículos de 8 mm de diámetro, y en menor porcentaje en folículos de 4 mm.

Al parecer, la presencia de este posible esteroide sulfatado esté relacionado con la actividad de aromatasa, ya que su mayor producción se detecta cuando las células se incuban con andrógenos aromatizables, y tal vez este metabolito sea un paso intermediario en la transformación de andrógenos en estrógenos o tal vez se trate de un mecanismo de regulación de los niveles de andrógenos (20).

Para determinar la identidad de este posible esteroide sulfatado se deberá realizar la desulfatación ácida, y posterior a esto, identificarlo por cromatografía en capa delgada.

Heterogeneidad Folicular

Los resultados obtenidos con el metabolismo de esteroides exógenos radiomarcados mostraron diversidad, entre los diferentes experimentos, en los valores absolutos de los metabolitos acumulados, a pesar de haber controlado el tipo celular utilizado y el tamaño folicular empleado. No obstante, se puede apreciar que indistintamente de la variabilidad en los porcentajes de transformación, se pueden distinguir patrones de

actividad esteroidogénica, lo que significa que solamente varió la magnitud de las diferencias esteroidogénicas entre los dos tipos celulares estudiados. Otros autores también han observado, en cerdas, heterogeneidad en la producción de esteroides por los folículos preovulatorios del mismo tamaño e incluso provenientes del mismo ovario (18,32). Hunter propone que en las especies con ovulación múltiple, los folículos destinados para ovular no se encuentran en el mismo estado de maduración en el momento en que son seleccionados para iniciar su fase de desarrollo por lo que pueden existir variaciones morfológicas y bioquímicas entre los folículos del mismo tamaño.

Dado que en el presente trabajo no se determinó el día del ciclo ovárico, podría sugerirse que el grado de maduración entre los diferentes folículos del mismo tamaño puede ser diferente y por lo tanto, explicar parcialmente las diferencias en la magnitud de la actividad esteroidogénica. En este sentido, se ha propuesto que el tratamiento con suero de yegua preñada, seguido por la administración de hCG, puede sincronizar la producción de una población de folículos con un grado uniforme de desarrollo; sin embargo, los resultados obtenidos con este tratamiento aún son contradictorios (32).

CONCLUSIONES

De los resultados anteriores pueden obtenerse las siguientes conclusiones.

- 1.- El procedimiento para obtener suspensiones celulares de teca y granulosa, provenientes de folículos preovulatorios de cerdas fue adecuado, dado que éstas mostraron capacidad de metabolizar esteroides exógenos de manera similar a lo reportado por otros autores. Sin embargo, la heterogeneidad en la actividad esteroidogénica observada entre los folículos del mismo tamaño se podría uniformar sensibilizando previamente a las cerdas con el suero de yegua preñada y posteriormente administrándoles hCG, como ha sido sugerido previamente. No obstante, debe señalarse que los resultados obtenidos no reflejarán necesariamente una situación fisiológica.

- 2.- El método de seguimiento isotópico, utilizado en el presente trabajo, permitió obtener un panorama de las posibles vías de síntesis de esteroides en los dos tipos celulares empleados, dado que la presencia de las enzimas involucradas se manifestó por la acumulación de sus productos del metabolismo. De esta manera, se pudo ubicar la actividad de las enzimas P450c17 y 3 β -HSD en las células de la teca, mientras que las enzimas 17 β -HSD, P450arom, 5 α -reductasa y posiblemente una sulfotransferasa, en las células de

la granulosa (figura 9). Por lo anterior, se puede concluir que la síntesis de andrógenos a partir de pregnenolona se lleva a cabo en las células de la teca, mientras que la síntesis de estrógenos se realiza principalmente en las células de la granulosa. La contribución por las células de la teca para la producción de estrógenos puede ser mínima, puesto que a igual número de células, la actividad predominó en las células de la granulosa.

3.- No fue posible observar diferencias claras en el metabolismo de esteroides entre los folículos de diferentes tamaños. Lo anterior puede estar relacionado con la heterogeneidad en la madurez folicular entre folículos del mismo tamaño.

4.- La presencia de xantinas en el medio de incubación incrementó los porcentajes de acumulación de ciertos metabolitos, en particular del 17 β -estradiol y del metabolito sulfatado, lo que podría sugerir un papel del CAMP en la regulación de la actividad de la 17 β -HSD y de la sulfotransferasa. Sin embargo, esta hipótesis deberá ser confirmada posteriormente, así como la identidad del esteroide sulfatado y su relación con la síntesis de estrógenos.

El trabajo realizado ha permitido conocer la localización de las diferentes enzimas que intervienen en la síntesis de esteroides por el folículo ovárico del porcino, además de parte

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

del metabolismo reductivo de los mismos, como son los 5 α -reducidos, así como la localización de la actividad de sulfotransferasa.

Dado que los resultados obtenidos no concuerdan totalmente con "La teoría de dos células, dos gonadotropinas", propuesta anteriormente para la síntesis de estrógenos, algunos autores proponen la "Teoría de una célula y media" (6) para tratar de explicar el comportamiento de la síntesis de esteroides en el folículo ovárico del porcino, el cual muestra similitudes con nuestros resultados, sin embargo se requiere de más estudios.

Por otro lado se requiere mayor investigación respecto de la participación del adenosin monofosfato cíclico (cAMP) como segundo mensajero en el caso de las enzimas aromatasa y sulfotransferasa y del metabolismo reductivo de los esteroides.

LITERATURA CITADA

- 1.- Aisnworth, L., Tsang, B.K., Downey, B.R. and Marcus, G.J.:The synthesis and actions of steroids and prostaglandins during follicular maturation in the pig. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 40:137-150 (1990).
- 2.- Balinsky, B.I.:An Introduction to Embryology. 4th. Ed. *W.B. Saunders Company*, Philadelphia, 1985.
- 3.- Banks, J.W.:Histología veterinaria aplicada. *El Manual Moderno, S.A. de C.V. México, D.F.*, 1986.
- 4.- Brodie, A.M., Schwarzel, W.C. and Brodie, H.J.:Studies on the mechanism of estrogen biosynthesis in the rat ovary. *J. Steroid Biochem.*, 7:787-793 (1976).
- 5.- Caubo, B., Vinna de, R.S. and Tonetta, S.A.:Regulation of steroidogenesis in cultured porcine theca cells by growth factors. *Endocrinology.*, 125:321-326 (1989).
- 6.- Conley, A.J. and Howard, H.J.:Steroidogenic enzyme expression in porcine preovulatory follicles. *Biol. Reprod. Suppl.1*, 48:92 (1993).

- 7.- Evans, G., Dobias, M., King, G.J. and Armstrong, D.T.: Estrogen, androgen and progesterone biosynthesis by theca and granulosa of preovulatory follicles in the pig. *Biol. Reprod.*, 25:673-82 (1981).
- 8.- Falck, B.: Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in microtransplants. *Acta Physiol. Scand.* 47 Suppl., 163:94-101 (1959).
- 9.- Fortune, J.E.: Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol. Reprod.*, 35:292-299 (1986).
- 10.- Foxcroft G.R. and Hunter, G.M.: Basic physiology of follicular maturation in the pig.: *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 33:1-19 (1985).
- 11.- Garrett, W.M., Hoover, D.J., Shackleton, C.H.L., and Anderson, L.D.: Androgen metabolism by porcine granulosa cells during the process of luteinization *in vitro*: Identification of 19-Oic-Androstenedione as a major metabolite and possible precursor for the formation of C₁₈ neutral steroids. *Endocrinology.*, 129:2941-2950 (1991).
- 12.- Gore-Langton, R.E. and Armstrong, D.T.: Follicular steroidogenesis and its control. In: *The physiology of Reproduction*. Edited by Knobil, E. and Neill, J.

Volume I, 331-385. Raven Press, New York, 1988.

- 13.- Grant, S.A., Hunter, M.G. and Foxcroft, G.R.: Morphological and biochemical characteristics during ovarian follicular development in the pig. *J. Reprod. Fert.*, 86:171-183 (1989).
- 14.- Greenwald, S.G. and Terranova, F.P.: Follicular selection and its control. In: *The physiology of Reproduction*. Edited by Knobil, E. and Neill, J. Volume I, 387-445. Raven Press, New York, 1988.
- 15.- Hafez, E.S.E.: Reproducción e inseminación artificial en animales 5ª ed. *Interamericana Mc.graw-Hill*. México D.F., 1989.
- 16.- Haney, A.F. and Schomberg, D.W.: Estrogen and progesterone production by developing porcine follicles *in vitro*: Evidence for estrogen formation by theca. *Endocrinology.*, 109:971-977 (1981).
- 17.- Hanukoglu, H.: Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, 43:779-804 (1992).
- 18.- Hunter, M.G. and Wiesak, T.: Evidence for and implications of follicular heterogeneity in pigs. *J.*

Reprod. Fert. Suppl., 40:163-177 (1990).

- 19.- Leeson, C.R., Leeson, T.S. y Paparo, A.A.: *Histologia*. 5ª ed. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. México D.F., 1987.

- 20.- Lischinsky, A., Khalil, M.W., Hobkirk, R. and Armstrong, D.T.: Formation of androgen conjugates by porcine granulosa cells. *J. Steroid Biochem.*, 19:1435-1440 (1983).

- 21.- Moor, R.M.: Sites of steroid production in ovine Graafian follicles in culture. *J. Endocr.*, 73:143 (1977).

- 22.- Moor, R.M., Hay, M.F., Dott, H.M. and Cran, D.G.: Macroscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep. *J. Endocr.*, 77:309-318 (1978).

- 23.- Pedernera, E., Gómez, Y., Velázquez, P., Juárez-Oropeza, M.A. and González del Pliego, M.: Identification of steroidogenic cell subpopulations in the ovary of the newly hatched chicken. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 71:153-162 (1988).

- 24.- Short, R.V.: 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 (1962).
- 25.- Sisson, S. and Grossman, J.D.: Anatomía de los animales domésticos Tomo I y II. 5ª ed. Salvat Editores, México, D.F., 1982.
- 26.- Stoklosawa, S., Gregoraszczyk, E. and Channing, C.P.: Estrogen and progesterone secretion by isolated cultured porcine thecal and granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 26:943-52 (1982).
- 27.- Tennant, J.R.: Evaluation of the trypan blue technique for the determination of cell viability. *Transplantation.*, 2:685-694 (1964).
- 28.- Tonetta, S.A., Vinna De R.S. and Zeraga di, G.S.: Modulation of porcine thecal cell aromatase by human chorionic gonadotropin, progesterone, estradiol-17 β , and dihydrotestosterone. *Biol. Reprod.*, 35:785-791 (1986).
- 29.- Tsang, B.K., Armstrong, D.T. and Whitfield, J.F.: Steroid biosynthesis by isolated human ovarian follicular cells in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51:1407-1411 (1980).

- 30.- Tsang, B.K., Ainsworth, L., Downey, B.R. and Marcus, G.J.:Differential production of steroids by dispersed granulosa and theca interna cells from developing preovulatory follicles of pig. *J. Reprod. Fert.*, 74:459-471 (1985).
- 31.- Velázquez, P., Gómez, Y., González del Pliego, M. and Pedernera, E.:Steroidogenic cell subpopulations obtained from the theca of preovulatory follicles in the ovary of the domestic fowl. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 83:243-248 (1991).
- 32.- Wiesak, T., Hunter, M.G. and Foxcroft, G.R.:Differences in follicular morphology, steroidogenesis and oocyte maturation in naturally cyclic and PMSG/hCG-treated prepuberal gilts. *J. Reprod. Fert.*, 89:633-641 (1990).