

Tesis de Posgrado

Efectos de la interacción entre células tecaes y granulosa sobre la esteroidogénesis en el folículo ovárico porcino

Lischinsky, Adriana Leonor

1983

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Lischinsky, Adriana Leonor. (1983). Efectos de la interacción entre células tecaes y granulosa sobre la esteroidogénesis en el folículo ovárico porcino. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1775_Lischinsky.pdf

Cita tipo Chicago:

Lischinsky, Adriana Leonor. "Efectos de la interacción entre células tecaes y granulosa sobre la esteroidogénesis en el folículo ovárico porcino". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1775_Lischinsky.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

EFFECTOS DE LA INTERACCION ENTRE CELULAS
TECALES Y GRANULOSAS SOBRE LA ESTEROIDOGENESIS
EN EL FOLICULO OVARICO PORCINO

AUTOR: Adriana Leonor Lischinsky
DIRECTOR: Dr. David Thomas Armstrong

Tesis presentada para optar al Título de
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

-1983-

J775
Ej. 2.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud al Dr. David T. Armstrong por la oportunidad que me dio de trabajar en su Laboratorio, y por su consejo y apoyo durante el curso de estos estudios. También deseo expresar el respeto y admiración que siento por él como científico y como ser humano.

No tengo palabras para expresar mi gratitud al Dr. Carlos P. Lantos por su apoyo incondicional en cada etapa de mis estudios. Desde 1975 en que me permitió trabajar a su lado por algunos meses hasta el presente ha sido la persona a la que he recurrido siempre que se me presentara un problema, y de quien siempre recibí especial atención.

Agradezco especialmente al Dr. Ronald Hobkirk por su consejo así como por permitirme usar las facilidades de su Laboratorio para la cromatografía en DEAE-Sephadex. Sin su ayuda, todo el trabajo en conjugados esteroideos hubiera sido imposible de realizar.

Estoy también agradecida a distintos miembros del MRC Group in Reproductive Biology de Canadá por su ayuda técnica así como por valiosísimas discusiones.

Agradezco al Dr. Eduardo Charreau por su estímulo para que este trabajo fuera presentado.

Finalmente quiero agradecer a mis padres por ser como son. Nada hubiera sido posible sin su aliento y apoyo incondicional.

INDICE

	página
AGRADECIMIENTOS.....	ii
INDICE.....	iv
ABREVIATURAS.....	vii
1.0 INTRODUCCION.....	1
1.1 Estructura del folículo ovárico y crecimiento folicular.....	1
1.2 Caminos para la esteroidogénesis en las góna- das.....	5
1.3 Biosíntesis de esteroides en el folículo ovári- co porcino.....	9
1.3.1 Unión de gonadotrofinas a células teca- les y granulosas.....	9
1.3.2 Capacidad esteroidogénica de células granulosas.....	10
1.3.3 Capacidad esteroidogénica de prepara- ciones tecales.....	13
1.3.4 Factores intraováricos en la regulación de la esteroidogénesis folicular.....	16
1.3.4.1 Esteroides.....	16
1.3.4.2 Factores no esteroideos.....	19
1.3.5 Resumen.....	20
1.4 Formación y probable rol de los sulfatos de esteroides en las glándulas esteroidogénicas...	20
1.5 Propósitos de este trabajo.....	28
2.0 MATERIALES Y METODOS.....	31
2.1 Animales.....	31
2.2 Aislamiento de células tecales y granulosas....	31
2.3 Condiciones generales de cultivo.....	32
2.4 Determinación de esteroides.....	35
2.5 Determinación de proteínas.....	39
2.6 Extracción de esteroides de medio de cultivo..	40

	página
2.7 Estudio del metabolismo de andrógenos.....	41
2.7.1 Condiciones de cultivo.....	41
2.7.2 Preparación de las columnas de DEAE-Sephadex.....	42
2.7.3 Cromatografía en DEAE-Sephadex A 25.....	43
2.7.4 Hidrólisis de sulfatos de esteroides.....	44
2.7.5 Cromatografía en capa delgada.....	44
2.7.6 Cromatografía líquida de alta presión.....	45
2.7.7 Reducción con borohidruro de sodio.....	47
2.7.8 Oxidación con el reactivo de Jones.....	47
2.7.9 Determinación de la actividad de sulfotransferasa.....	48
2.8 Efecto de testosterona sobre la utilización de progesterona por células granulosas.....	49
2.9 Análisis de los resultados.....	50
3.0 RESULTADOS.....	51
3.1 Rol de las células granulosas en la síntesis de andrógenos.....	51
3.1.1 Efecto de medio usado por células granulosas sobre la síntesis tecal de andrógenos.....	51
3.1.2 Efecto de medio usado extraído con carbón-dextrán sobre la síntesis tecal de andrógenos.....	55
3.1.3 Concentración de esteroides en medio usado por células granulosas.....	58
3.1.4 Efecto de C ₂₁ -esteroides sobre la síntesis tecal de andrógenos.....	61
3.2 Rol de las células granulosas en el metabolismo de andrógenos.....	64
3.2.1 Capacidades relativas de los tipos celulares foliculares para sintetizar andrógenos y estrógenos.....	64
3.2.2 Capacidades relativas de los tipos celulares foliculares para metabolizar andrógenos.....	67
3.2.3 Metabolismo de andrógenos por células granulosas.....	68
3.2.4 Actividad de sulfotransferasa en células granulosas.....	70

3.2.5	Estudios tendientes a la identificación de los metabolitos conjugados por las células granulosas.....	73
3.3	Efecto de la teca sobre la síntesis de progesterona por las células granulosas.....	86
3.3.1	Efecto de los andrógenos sobre la acumulación de progesterona por células granulosas.....	86
3.3.2	Efecto de la testosterona sobre el metabolismo de progesterona.....	92
3.3.3	Efecto de 17β -estradiol sobre la síntesis de progesterona.....	94
3.4	Mecanismo por el cual los andrógenos inhiben la síntesis de progesterona por células granulosas en respuesta a FSH.....	96
3.4.1	Relación temporal entre la acumulación de progesterona y 17β -estradiol en cultivo en presencia de FSH y testosterona.....	96
3.4.2	Efecto de un inhibidor de la aromata-sa sobre la inhibición de la síntesis de progesterona por testosterona.....	99
3.4.3	Efecto de testosterona sobre la síntesis de progesterona estimulada por di-butiril-AMP cíclico.....	102
3.4.4	Efecto de los andrógenos sobre la síntesis de pregnenolona por células granulosas.....	106
4.0	DISCUSION.....	115
4.1	Rol de las células granulosas en la síntesis de andrógenos.....	115
4.2	Capacidades relativas de los tipos celulares foliculares aislados y en recombinación para sintetizar andrógenos y estrógenos.....	119
4.3	Síntesis de sulfatos de andrógenos.....	122
4.4	Efecto de la teca sobre la síntesis de progesterona por las células granulosas.....	126
5.0	CONCLUSIONES.....	138
6.0	BIBLIOGRAFIA.....	144

ABREVIATURAS

Δ^4 A	Δ^4 -Androstenediona.
4 a A	4-Acetoxi-androstenediona.
AMP cíclico	3', 5'-Adenosina monofosfato cíclico.
Androsterona	5 α -Androstan-3 α -ol-17-ona.
(Bu) ₂ c AMP	N ⁶ , O ² -dibutiril adenosina 3'-5'- monofosfato cíclico.
C ₁₉ -Esteroides	Esteroides de 19 átomos de carbono.
C ₂₁ -Esteroides	Esteroides de 21 átomos de carbono.
DEAE-Sephadex	Dietilaminoetil-Sephadex.
Dehidroepiandrosterona (DHEA)	5-Androsten-3 β -ol-17-ona.
D.I.	Diámetro interno.
Dihidrotestosterona (DHT)	5 α -Androstan-17 β -ol-3-ona.
Epiandrosterona	5 α -Androstan-3 β -ol-17-ona.
E.S.	Error standard.
Etiocolanolona	5 β -Androstan-3 α -ol-17-ona.
HEPES	N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2- etanosulfónico.
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión.

M _A	Medio usado por células granulosas control.
M _B	Medio usado por células granulosas estimuladas con FSH.
MEM	Medio Esencial Mínimo.
RIA	Radioinmunoensayo.
T	Testosterona.

1.0 INTRODUCCION

1.1 Estructura del Folículo Ovárico y Crecimiento Folicular.

La capacidad para la reproducción normal depende del doble rol del ovario en proveer células germinales maduras y hormonas esteroideas que regulan su crecimiento y preparan al tracto reproductivo para el transporte de óvulos y la implantación. Los componentes funcionales más importantes del ovario maduro son los folículos y el cuerpo lúteo.

El folículo ovárico maduro es una estructura esférica casi totalmente embebida en la matriz de tejido conectivo del ovario, pero visible desde la superficie como una vesícula translúcida (1). Su pared está compuesta por 3 capas:

- 1) La teca externa, compuesta de bandas concéntricas de fibroblastos conectados entre sí por fibrillas de colágeno embebidas en mucopolisacárido, responsable de la elasticidad de la pared folicular.
- 2) La teca interna, formada por una red de fibroblastos en que están suspendidas células vacuoladas, secretoras de esteroides. Un plexo capilar denso y varios vasos linfáticos pro -

veen la irrigación sanguínea y drenaje linfático a las capas externas de la pared folicular. Este aporte sanguíneo es la fuente de nutrientes necesarios para mantener a las células granulosas y al ovocito, ya que no existen capilares luego de la membrana basal que separa a la teca interna de las células granulosas.

- 3) Las células granulosas, células columnares pseudoestratificadas que encierran una cavidad llena de fluido donde se encuentra el ovocito. Estas células son muy activas en la biosíntesis de proteínas (2, 3) y serían responsables de la síntesis de moduladores de ciertas funciones foliculares además de desempeñar un rol fundamental en la biosíntesis de esteroides.

Una de las características notables del ovario es que desde el nacimiento contiene una cantidad muy grande de células germinales no proliferantes, en exceso al número que se necesitará durante toda la vida reproductiva. En el humano, al nacer, el ovario contiene 2.000.000 de ovocitos (4) de los cuales un máximo de 400 ovulará durante todos los años reproductivos activos. Cada día un número de folículos empieza a crecer; aunque las señales que hacen que un determinado folículo

empiece a crecer son desconocidas, una vez que el crecimiento es iniciado, estos folículos continuarán creciendo hasta que ocurra atresia (degeneración) u ovulación (5, 6).

El crecimiento folicular está caracterizado por la formación de la capa granulosa, aparentemente mediado por influencias inductivas locales del ovocito (7). Esto está seguido por la aparición de la membrana basal, aparentemente segregada por la capa de células granulosas, y la organización de células es tromales circundantes en una capa te cal externa a la membrana basal (5). El desarrollo folicular posterior involucra crecimi en to del ovocito y proliferación de células tecales y granulosas. Los cambios en estas células parecen ser interdependientes y secuenciales, parcialmente coordinados con, y dependientes de, los cambios cíclicos en secreción gonadotrófica (8).

Ovulación y luteinización son los estadíos terminales de diferenciación de folículos grandes, preovulatorios. En respues ta al pico gonadotrófico, uno o más folículos, dependiendo de la especie, presentan hipertrofia de células tecales y granulo sas (9), disolución de la membrana basal, ruptura del contacto célula-célula entre células granulosas (10), iniciación de me iosis en el ovocito (11). El folículo distendido se rompe, y el

óvulo es expulsado hacia la cavidad abdominal, tomado por los tubos uterinos y transportado al útero. El folículo que se rompe al ovular, se llena con sangre. Las células tecales y granulosas proliferan rápidamente, y la sangre coagulada es reemplazada por células lúteas, ricas en lípidos, esteroideogénicamente activas. Si ocurre implantación, el cuerpo lúteo persiste. Si no, empieza a degenerar, siendo reemplazado por el cuerpo albicante.

Las hormonas esteroideas, secretadas por células tecales y granulosas en respuesta a estimulación gonadotrófica, están involucradas en varios aspectos de la diferenciación de los componentes del folículo ovárico y son esenciales para el mantenimiento de las funciones gonadales. También son componentes importantes de mecanismos de retroalimentación que regulan la secreción gonadotrófica mediante acciones sobre el sistema hipotálamo-hipofisario (12a). Estudios más recientes han demostrado que los esteroides ováricos también ejercen acciones significativas a nivel de las células esteroideogénicas influyendo en el tipo y extensión de su respuesta a la estimulación gonadotrófica (12 b). Debido a esto es importante entender el control de su biosíntesis.

1.2 Camino para la Esteroidogénesis en las Gónadas.

Los caminos para la biosíntesis de esteroides gonadales están bien establecidos; los caminos y mecanismos enzimáticos han sido reseñados por Engel (13). Se está de acuerdo en que existen caminos esencialmente similares en todo tejido esteroidogénico (gónadas, corteza adrenal y placenta) para la formación de los precursores comunes a estos tejidos (incluyendo ácido mevalónico, escualeno, colesterol y pregnenolona). Alguna divergencia en caminos ocurriría luego, en el camino hacia los andrógenos, con pregnenolona siendo sometida a 17α -hidroxilación directa y ruptura de cadena lateral (por C₁₇-20 liasa) (camino Δ^5), antes de la conversión mediante el sistema 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa- Δ^5 isomerasa, o siendo convertida a progesterona por medio de este sistema enzimático antes de experimentar 17α -hidroxilación y ruptura de la cadena lateral (camino Δ^4).

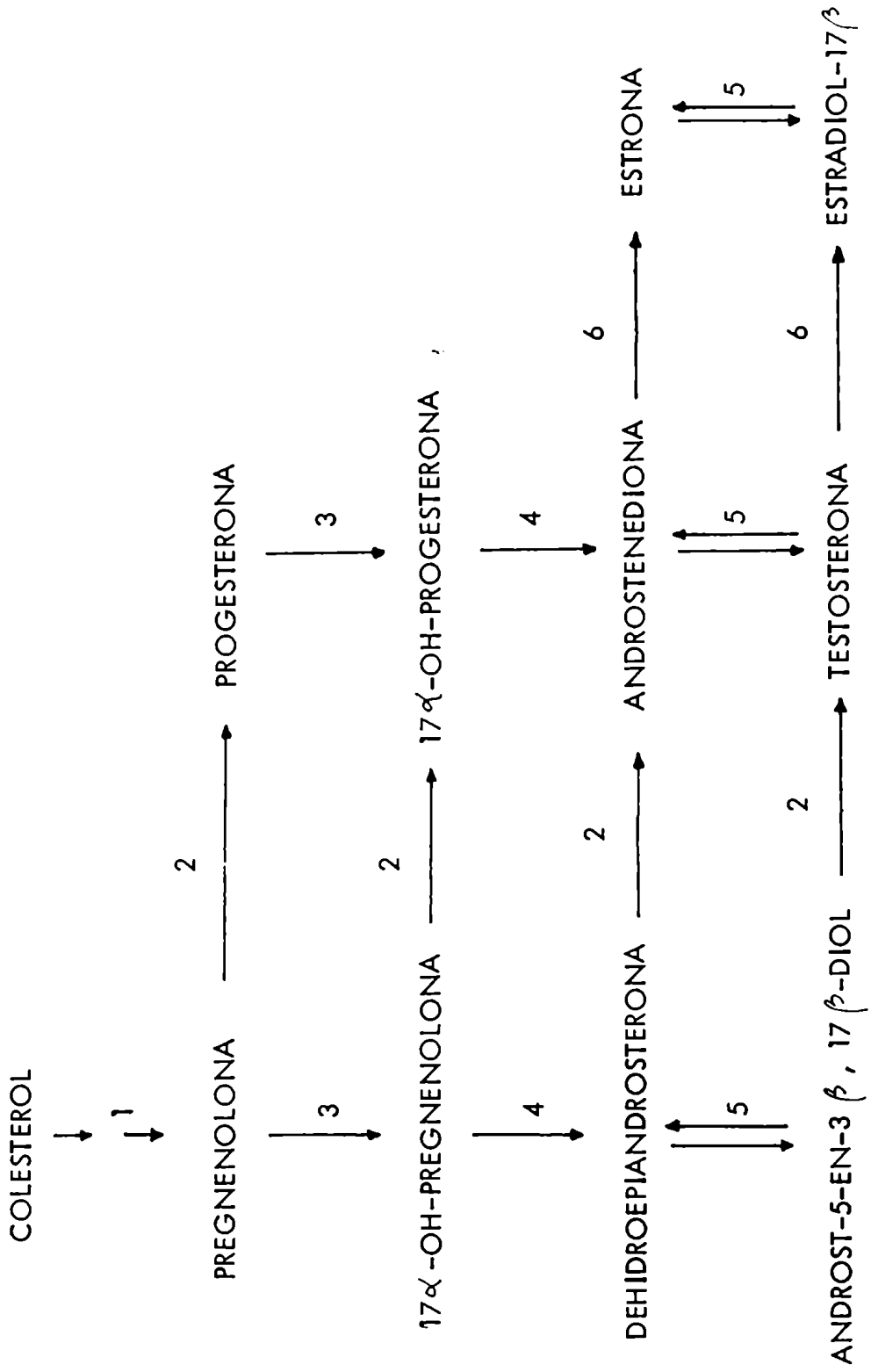
Androstenediona y testosterona son convertidas a estrona y 17β -estradiol, respectivamente, por una serie de reacciones integradas que involucran 19-hidroxilación, escisión del metilo en carbono 10, y deshidrogenación del anillo A, referidas colectivamente como aromatización. Estas reacciones son

catalizadas por una secuencia de enzimas referidas colectivamente como aromatasa. Los caminos generalmente aceptados para la biosíntesis de estrógenos están resumidos en la Figura 1.

En lugar de ser secretados directamente, o convertidas a estrógenos, androstenediona y testosterona pueden experimentar suertes metabólicas distintas dentro de testículo y ovario. Estas incluyen saturación de sus anillos A por la Δ^4 esteroide- 5α reductasa, dando 5α -androstano-3,17-diona y 17β -hidroxi- 5α -androstano-3-ona (5α -dihidrotestosterona, DHT), seguido por reducción estereoespecífica de sus grupos 3-ceto por la 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, a androsterona y 5α -androstano- $3\alpha',17\beta$ -diol. Ya que las 5α -reductasas son aparentemente irreversibles (14) y los componentes con anillo A saturado no pueden experimentar aromatización (13), el metabolismo intragonadal de androstenediona y testosterona a lo largo de este camino podría desempeñar un rol regulatorio en la biosíntesis de estrógenos, desviando a estos sustratos del camino de la aromatasa. Además, existe evidencia de que ciertos andrógenos 5α -reducidos son potentes inhibidores de la aromatasa (15, 16), ofreciendo otro mecanismo potencial para la regulación de la formación de estrógenos.

Figura 1: Caminos para la biosíntesis de estradiol en las gónadas.

- 1: enzimas de ruptura de cadena lateral de colesterol.
- 2: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa / Δ^5 -isomerasa.
- 3: 17 α -hidroxilasa.
- 4: C₁₇₋₂₀ liasa.
- 5: 17 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa.
- 6: aromatasa.



1.3 Biosíntesis de Esteroides en el Folículo Ovárico Porcino.

1.3.1 Unión de Gonadotrofinas a Células Tecales y Granulosas.

Las células granulosas poseen receptores para la hormona folículo-estimulante (FSH). Células derivadas de folículos pequeños (1-2 mm) unen más FSH que células de folículos medianos (3 - 5 mm) y grandes (7 - 12 mm) (17). Esta unión resulta en mayor producción de AMP cíclico (18), y dibutiril AMP cíclico puede simular los efectos esteroidogénicos de FSH en las células granulosas (19).

Las células granulosas provenientes de folículos antrales pequeños no poseen receptores para la hormona luteinizante (LH); células granulosas derivadas de folículos de tamaño mediano unen cantidades significativas de gonadotrofina coriónica humana (hCG; esta gonadotrofina se une a los receptores a LH), mientras que células provenientes de folículos grandes unen más hCG (20, 21, 22).

No se han podido detectar receptores a FSH en células tecales de las distintas especies estudiadas. Sin embargo, el tejido tecal une hCG; tejido proveniente de folículos grandes une más hCG que el obtenido de folículos pequeños del mismo

o de otros ovarios (23).

1.3.2 Capacidad Esteroidogénica de Células Granulosas.

Los primeros estudios sobre biosíntesis de esteroides "in vitro" por células granulosas aisladas fueron realizados en el ovario porcino, por Bjersing y Carstensen (24, 25). Estos autores incubaron células granulosas provenientes de folículos de tamaño mediano con distintos intermediarios esteroideos en la cadena biosintética, radioactivos. Sus hallazgos más importantes fueron:

- 1.- Las células granulosas contienen 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 20α -hidroxiesteroide deshidrogenasa eficientes.
- 2.- Las células granulosas tienen baja actividad de 17α -hidroxilasa y C_{17-20} liasa y, por lo tanto, son relativamente incapaces de sintetizar andrógenos.
- 3.- Las células granulosas poseen 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (que convierte Δ^4 -androstenediona a testosterona) y aromatasa activas.

La mayor parte de estas actividades enzimáticas fueron confirmadas independientemente mediante estudios histoquímicos (26).

Estudios subsiguientes sobre las capacidades esteroideogénicas de las células granulosas consistieron en la determinación de las esteroides producidos a partir de precursores endógenos. En 1970, Channing (27) informó que las células granulosas producían progesterona en cultivo, siendo esta síntesis estimulada por FSH y/o LH dependiendo del tamaño de los folículos de los que provenían.

La incapacidad de las células granulosas porcinas de sintetizar cantidades apreciables de andrógenos a partir de precursos endógenos ha sido confirmada por Tsang y col. (28) y Evans y col. (29), y está de acuerdo con estudios en casi todas las especies (para una descripción detallada ver 30).

Aunque las células granulosas parecen ser incapaces de sintetizar cantidades significativas de andrógenos, pueden convertir eficientemente andrógenos a estrógenos (28). La capacidad de convertir testosterona a 17β -estradiol cambia durante el desarrollo folicular. Anderson y col. (31) cultivaron células granulosas derivadas de folículos antrales porcinos pequeños, medianos y grandes (obtenidos de material de matadero) con o sin andrógenos. Las células granulosas de todos los tamaños de folículos secretaron pequeñas cantidades de 17β -

estradiol. La adición de testosterona o Δ^4 -androstenediona resultó en un aumento de 8 a 420 veces en la secreción de estrógenos. Se observó la menor conversión con células granulosas provenientes de folículos pequeños y la mayor con células provenientes de folículos medianos y grandes.

Adición de FSH junto con testosterona no produjo efecto alguno sobre la secreción de 17β -estradiol por células granulosas de folículos pequeños y medianos, aunque aumentó la secreción de estrógenos por células granulosas derivadas de folículos grandes. Esto no puede ser explicado por cambios en los receptores a FSH, que son menores en número en células granulosas de folículos grandes. Los investigadores lo explicaron considerando que tal vez el porcentaje de receptores a FSH acoplados a una respuesta que resulta en estimulación de la actividad de aromatasa es mayor en células de folículos grandes, o que la aromatasa no es capaz de responder hasta que las células granulosas se encuentren en un estado más maduro. Usando un modelo distinto, la cerda prepúber tratada con PMSG (gonadotropina de suero de yegua preñada) para inducir el desarrollo folicular, Evans y col. (29) observaron menor conversión de andrógenos a estrógenos al madurar el folículo, y ningún efecto de las gonadotropinas sobre la aromatasa. La ausen-

cia de un efecto de FSH sobre la aromatasa parece contrastar con el rol de FSH en la estimulación de la aromatasa "in vivo" e "in vitro" en células granulosa derivadas de roedores de laboratorio (32, 33). Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios para determinar si en el cerdo, como en la rata, FSH induce actividad de aromatasa en células granulosa que no han sido expuestas a FSH "in vivo".

1.3.3 Capacidad Esteroidogénica de Preparaciones Tecales

Las preparaciones tecales sintetizan cantidades elevadas de andrógenos (predominantemente Δ^4 -androstenediona), siendo esta síntesis estimulada por LH en todos los estadios del desarrollo (28, 29). La teca es deficiente en 17 β -hidroxisteroide deshidrogenasa y, por lo tanto, incapaz de convertir grandes cantidades de Δ^4 -androstenediona a testosterona (25).

La capacidad del tejido tecal porcino de sintetizar 17 β -estradiol depende del estadio del desarrollo folicular. Stoklosowa y col. (34) separaron teca interna de folículos grandes (diámetro: 10-12 mm), la dispersaron e incubaron como monocapas; observaron que la producción de estrógenos por células tecales era mayor que la producción por células granu

losas derivadas de los mismos folículos.

Usando preparaciones tecales derivadas de folículos de tamaño mediano (4-6 mm), Tsang y col. (28) fueron incapaces de observar síntesis de 17β -estradiol. Evans y col. (29) observaron que la teca contribuye tanto como las células granulosa a la síntesis folicular de estrógenos en los folículos más maduros, mientras que, durante los estadios más tempranos del desarrollo folicular preovulatorio, la teca es incapaz de convertir andrógenos a estrógenos.

Recientemente, Haney y Schomberg (35) han informado que, en folículos porcinos de tamaño mediano (4-8 mm), la teca es responsable de la mayor parte de la producción folicular total de estrógenos. Los autores llegaron a esta conclusión porque la producción basal de estradiol fue mayor en cultivos tecales que en los de células granulosa y porque no observaron un aumento significativo al co-cultivar ambos tipos celulares. Sin embargo, cuando compararon la capacidad de células tecales y granulosa aisladas para aromatizar testosterona exógena encontraron que, en este caso, la producción de estradiol por las células granulosa era mayor. Ya que en el folículo las células granulosa están expuestas a niveles elevados de andrógenos en el fluido folicular (36), esto implica

que probablemente las células granulosas hacen una contribución más significativa a la síntesis folicular de estradiol también en este estadio, como fue observado anteriormente (28). La ausencia de efecto sobre la síntesis de estrógenos al co-cultivar ambos tipos celulares podría deberse a que las células granulosas metabolicen el andrógeno de origen teca a otros compuestos no aromatizables.

En conclusión, parece que la capacidad de la teca de sintetizar estrógenos aumenta con el desarrollo folicular. Estos resultados están de acuerdo con estudios en folículos ovinos (37) pero en contraste con estudios en roedores de laboratorio (38); en estos últimos la teca es incapaz de producir estrógenos en todos los estadios del desarrollo folicular que han sido examinados.

Los resultados obtenidos en distintas especies en base a estudios "in vitro" con tipos celulares ováricos aislados han llevado al planteo de la hipótesis bicelular bigonadotrófica para la biosíntesis folicular de estradiol: las células teca les sintetizan andrógenos, bajo la influencia de LH, que son transportados a las células granulosas, donde son aromatizados a estradiol, bajo la influencia de FSH (30). Esta hipótesis sería válida en roedores, en todos los estadios del desarrollo fo

licular preovulatorio y, en animales más grandes, en los estadios más tempranos del desarrollo folicular preovulatorio.

1.3.4 Factores Intraováricos en la Regulación de la Esteroidogénesis Folicular.

1.3.4.1 Esteroides.

Existe abundante evidencia de que los esteroides ováricos podrían modular la biosíntesis ovárica de otros esteroides mediante acciones directas sobre las células ováricas involucradas.

En preparaciones tecales derivadas de folículos ováricos porcinos de tamaño mediano, Tsang y col. (39) demostraron que 17β -estradiol inhibía significativamente la producción de testosterona y DHT de una manera dosis dependiente en presencia de LH. Ya que estradiol no afectó la síntesis tecal de AMP cíclico y progesterona, esto sugirió que el esteroide actuaría inhibiendo el sistema 17α -hidroxilasa/C₁₇-20 liasa o desviaría a los C₂₁-esteroides de este sistema estimulando caminos alternativos de metabolismo. En la rata, Leung encontró que estradiol inhibía la síntesis de andrógenos estimulada

por LH tanto "in vivo" como "in vitro" (40, 41). En esta especie se demostró que estradiol estimularía el metabolismo a pregnanos 5α -reducidos (42).

Se ha implicado a andrógenos y estrógenos en el control de la síntesis de progesterona en células granulosas. Se observó (43) que los estrógenos sinergizaban con hCG en la estimulación de la producción de progesterona por células granulosas derivadas de folículos de 5-8 mm. Schomberg y col. (44) examinaron el efecto de estos esteroides en la producción de progesterona por células granulosas derivadas de folículos porcinos de 3-5 mm. DHT estimuló significativamente la acumulación de progesterona en cultivos de 2 días mientras que testosterona no ejerció efecto alguno, y tanto dehidroepiandrosterona (DHEA) como 17β -estradiol inhibieron significativamente la acumulación de progesterona. Los autores concluyeron que la ausencia de efecto estimulador de testosterona o DHEA se debía a aromatización de estos esteroides a estrógenos, ya que las células granulosas eran capaces de aromatizar estos esteroides. Sin embargo, los autores no demostraron que esto estaba ocurriendo. Luego informaron que también en células granulosas aisladas de folículos de 8-10 mm, DHT estimulaba y 17β -estradiol inhibía la producción de progesterona (45).

Otros autores (46, 47) observaron que testosterona y 17β -estradiol inhibían la producción de progesterona en respuesta a FSH por células granulosas derivadas de folículos pequeños. Dado que DHT, un andrógeno no aromatizable, no produjo efecto alguno, estos investigadores concluyeron que éste era un efecto estrictamente estrogénico y que testosterona probablemente actuaba luego de ser aromatizada a estradiol.

Cultivando por 2 días células granulosas provenientes de folículos de tamaño mediano, Anderson y col. (31) no observaron un efecto significativo de los andrógenos sobre la acumulación de progesterona estimulada por FSH; en cambio, cuando las células fueron mantenidas en cultivo por 4 días, los andrógenos actuaron sinérgicamente con FSH estimulando la producción de progesterona.

En conclusión, se ha encontrado que los andrógenos y estrógenos podrían estimular o inhibir la producción de progesterona por células granulosas "in vitro", dependiendo de la longitud de los cultivos, el tamaño del folículo y/o condiciones de cultivo.

1.3.4.2 Factores no esteroideos.

Factores no esteroideos también han sido implicados en el control de la producción de progesterona en células granulosas. Ledwitz-Rigby y col. (48) observaron que fluido folicular derivado de folículos porcinos pequeños y medianos, extraído con carbón-dextrán, inhibía la luteinización morfológica y secreción de progesterona por cultivos de células granulosas de folículos preovulatorios porcinos. El fluido folicular también inhibió la acumulación de AMP cíclico basal y en respuesta a LH luego de un período de incubación de 24 a 48 horas. En cambio, fluido folicular derivado de folículos preovulatorios no produjo efecto alguno. Otros autores (49) hicieron una observación semejante al estudiar el efecto de fluido folicular humano sobre la acumulación de AMP cíclico en ovario de rata. Este inhibidor actuaría estimulando la actividad de fosfodiesterasa, ya que adición de isobutil-metil-xantina (inhibidor de fosfodiesterasa) fue capaz de revertir la acción del fluido sobre los niveles de AMP cíclico (50). También se encontró un estimulador de la secreción de progesterona en fluido folicular porcino (51). Este sería controlado por FSH.

Se ha observado la presencia en el ovario de factores

que unen gonadotrofinas. Se observó (52) inhibición de la unión de FSH a células granulosas por fluido folicular bovino. Estudios en cuerpo lúteo de rata (53) y cerdo (54) sugieren la existencia en este tejido de factores que unen LH. Se ha informado que la adición de extractos de cuerpo lúteo a células granulosas porcinas inhibe la secreción de progesterona en presencia o ausencia de LH exógeno (55).

1.3.5 Resumen.

Nuestro conocimiento actual de la biosíntesis de esteroides por células tecaes y granulosas del folículo ovárico porcino está resumido en la figura 2. Se ha omitido el efecto de los andrógenos y estrógenos sobre la síntesis de progesterona ya que la evidencia parece indicar que su efecto es aparente sólo después de 2-4 días en cultivo, cuando las células granulosas ya han luteinizado (27).

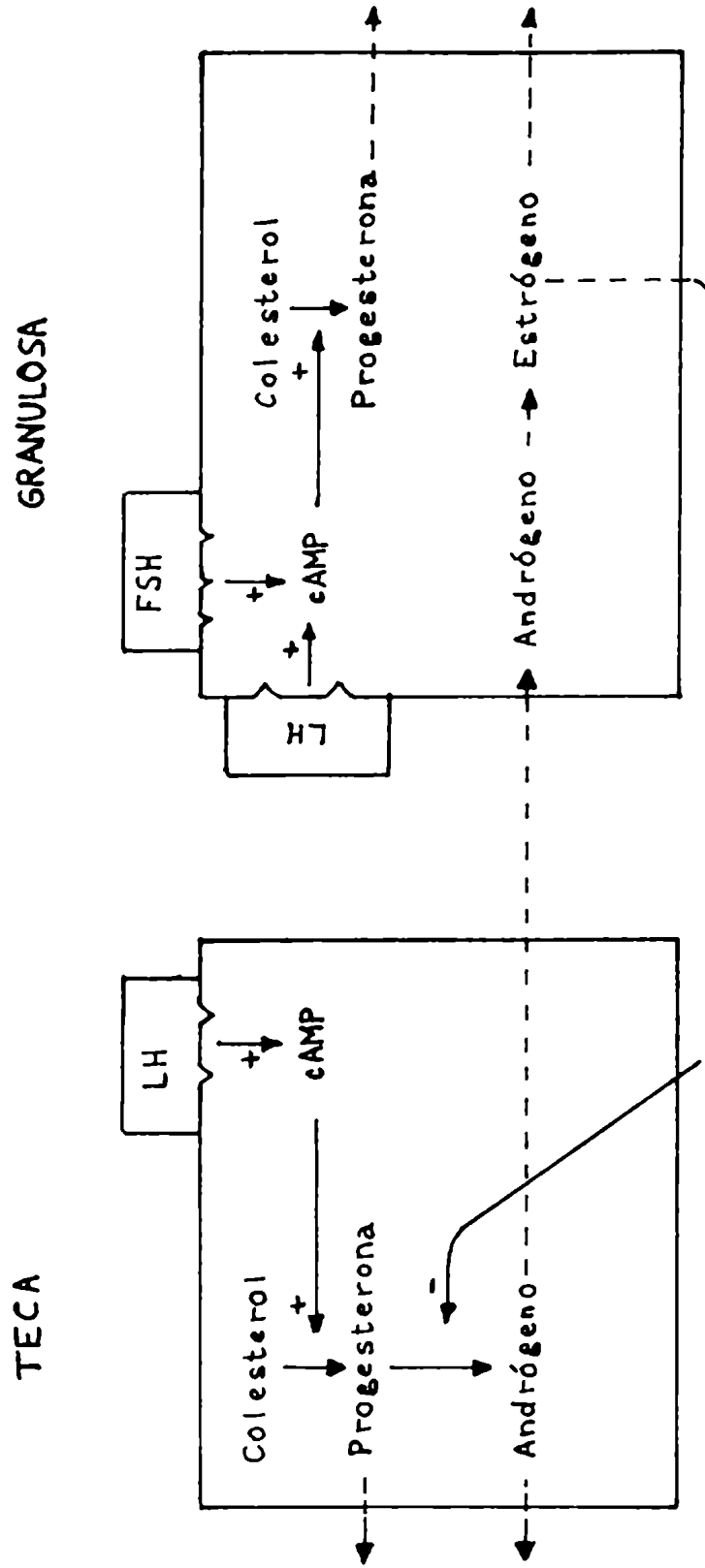
1.4 Formación y Probable Rol de los Sulfatos de Esteroides en las Glándulas Esteroidogénicas.

Por mucho tiempo los sulfatos de esteroides han sido

Figura 2: Rol de células tecales y granulosa en la esteroidogénesis en folículos porcinos de tamaño mediano.

Las líneas enteras representan caminos esteroidogénicos y acciones intraováricas de varias hormonas: + estimulación; - inhibición.

Las líneas quebradas representan flujo intercelular de esteroides.



considerados como meros productos metabólicos de hormonas esteroides, sintetizados en el hígado y excretados en la orina o bilis (56). En 1959, el sulfato de dehidroepiandrosterona fue aislado de un tumor adrenal y se demostró que era segregado por tejido hiperplástico adrenal (57). Estudios posteriores demostraron que el sulfato de DHEA es uno de los principales esteroides segregados por la glándula adrenal humana (58). Evidencia de secreción de este conjugado por una glándula esteroideogénica estimuló estudios de biosíntesis y metabolismo de conjugados esteroideos. La cantidad de estudios realizados en el período 1960-1970 fue enorme. Sólo se mencionarán aquellos trabajos relevantes para entender el probable rol de los sulfatos de esteroides en las glándulas esteroideogénicas, así como la mayor parte de la evidencia de su biosíntesis y metabolismo en el ovario.

Se ha observado la presencia de pequeñas cantidades de sulfatasa mamífera en hígado, testículo, ovario y adrenal (59). Su presencia en las glándulas esteroideogénicas ha sugerido un rol para los sulfatos de esteroides en la biosíntesis de esteroides así como en la regulación de los efectos de los esteroides en los tejidos efectores.

Varios 5-en-3^β-hidroxiesteroides conjugados con iones sulfato como sulfato de colesterol, de pregnenolona, de 17^α-hidroxipregnenolona y de DHEA han sido involucrados en la biosíntesis de hormonas esteroideas (60-63). Se ha demostrado que la secuencia de conversiones de colesterol a DHEA, vía pregnenolona y 17^α-hidroxipregnenolona, tiene lugar tanto para los 5-en-3^β-hidroxiesteroides libres (64-66) como para los correspondientes sulfatos de esteroides (60-63), en cuyo caso el grupo sulfato permanece en la molécula a través de toda la conversión. La participación y regulación de la actividad de sulfatasa (67-70), así como el rol de los sulfatos de esteroides como precursores de hormonas activas (58, 60, 63) también han sido estudiados extensamente. Esta participación ha sido observada en glándula adrenal, testículo y placenta. En esta última, existe una sulfatasa muy activa, y el sulfato de DHEA es un precursor importante en la síntesis de estrógenos (71, 72).

En la glándula adrenal se observó que la sulfatasa es la enzima limitante en la biosíntesis de esteroides (70, 73). En esta glándula, ACTH estimula la síntesis de corticoides actuando en una etapa previa a la formación de pregnenolona (69). Domínguez y col. (74) observaron que ACTH también esti

mula la actividad de sulfatasa por un mecanismo aparentemente independiente de AMP cíclico. A partir de sus resultados especularon que en la adrenal el mecanismo de acción de ACTH a través de AMP cíclico ocurriría en condiciones de stress mientras que la sulfatasa desempeñaría un rol en los mecanismos de retroalimentación regulatorios así como en aumentos pequeños en la ACTH circulante.

La importancia regulatoria de sulfotransferasas y sulfatasas ha sido estudiada extensamente en tejido testicular por el grupo de Notation. Este grupo describió la formación de sulfatos de esteroides y su retención en la sangre periférica como una función de almacenamiento (67). Esto proveería a cada tejido con una abundante cantidad de precursores monosulfatados para regulación "in situ" de los niveles de esteroides. La utilización de estos monosulfatos parecería estar bajo influencia esteroidea directa (68). Notation (75) presentó una reseña de evidencias que apoyan la premisa de que, a pesar de la baja actividad de la sulfatasa, la regulación de la hidrólisis de los monosulfatos esteroideos es importante para la biosíntesis de andrógenos primariamente en el sitio efector. La sulfatasa, independientemente del tejido del que proviene, parece ser una unidad monomérica con un sitio de unión de sulfato y un sitio

regulatorio de unión de esteroides. La asociación íntima del monómero o sus agregados con la membrana celular implica transporte y metabolismo de hormonas esteroideas. El autor presenta un modelo en que los monosulfatos de esteroides (sustra-
tos) contribuirían a la biosíntesis de andrógenos por medio de hidrólisis reguladas hormonalmente (modificadores o inhibidores esteroideos alostéricos) en la membrana celular por sulfatasas en el sitio de utilización de la hormona (producto esteroideo). Esto ocurriría en la barrera sangre-órgano en los tejidos efec-
tores a andrógenos y, en particular, como manera de regular el nivel de andrógenos en los túbulos seminíferos.

Ha habido controversias con respecto a la capacidad del ovario de formar sulfatos de esteroides. Estudios con homogenatos de tejido ovárico humano demostraron sólo una pequeña capacidad de sulfatación (76). Se ha observado formación de pequeñas cantidades de sulfatos de estrógenos en extractos de ovarios bovinos (77). También se informó secreción de sulfato de DHEA y de estrona (78, 79). Melville y Braunsberg (80) demostraron formación de sulfatos de DHEA y de estradiol por sobrenadante de tejido ovárico de sólo 7 de 12 ovarios humanos normales. Sin embargo, otros autores (81) no pudieron detectar se

creción o utilización de cantidades medibles de sulfatos de esteroides por ovarios humanos normales en ambas fases del ciclo. Estudios más recientes demostraron formación de sulfatos de testosterona, estrona y estradiol por tejido ovárico bovino y de rata (82) y por ovarios humanos perfundidos "in vitro" (83-85). La formación de sulfatos de estrógenos era estimulada por gonadotrofinas. En todos los casos se observó sólo una pequeña conversión a sulfatos, que los autores atribuyeron a baja actividad de la sulfotransferasa.

También existe evidencia de utilización de sulfatos esteroideos para la biosíntesis de esteroides en el ovario.

Se encontró actividad de sulfatasa en ovario humano (86). Se observó que el sulfato de DHEA es un precursor eficiente de andrógenos y estrógenos en ovarios humanos perfundidos (87). Luego de incubar ovarios de conejo con sulfato de DHEA, Payne y Mason (88) aislaron Δ^4 -androstenediona y testosterona. Patwardhan y Lanthier (89) observaron que tanto el tejido folicular como el estroma de ovario humano podían utilizar sulfato de DHEA como precursor para la formación de andrógenos y estrógenos.

1.5 Propósitos de este Trabajo.

Los componentes del folículo ovárico experimentan cambios notables durante el crecimiento folicular. Aunque estos cambios dependen de la secreción cíclica de gonadotrofinas hipofisarias, la concentración de gonadotrofinas a la que los distintos folículos están expuestos no explica porqué en cada ciclo sólo un número limitado de folículos en crecimiento (uno o más dependiendo de la especie) ovula y luteiniza en respuesta al pico gonadotrófico, mientras que los demás degeneran. Una explicación posible para esta respuesta diferencial de los folículos al mismo medio ambiente hormonal podría ser la concentración intrafolicular de hormonas esteroideas.

Los estrógenos estimulan la proliferación de las células granulosas y la sensibilidad del ovario a FSH (90, 91), mientras que los andrógenos, además de servir como sustratos para la síntesis de estrógenos, ejercen un efecto opuesto sobre el crecimiento folicular, promoviendo atresia (92). Por lo tanto, el balance entre la acumulación de andrógenos y la formación de estrógenos desempeñaría un rol significativo en determinar la suerte de un folículo. Debido a esto, la síntesis y/o el metabolismo de andrógenos deberían estar precisamente reguladas.

En folículos de rata (93) y oveja (94, 37) se ha observado que la eliminación de células granulosas de preparaciones tecales resulta en una disminución en la producción de andrógenos. Ya que las células granulosas son incapaces de sintetizar cantidades apreciables de andrógenos, uno de los propósitos de este trabajo es examinar el rol de las células granulosas en la síntesis y/o el metabolismo de andrógenos. También se estudiará el efecto de estos andrógenos sobre la esteroidogénesis por las células granulosas. Ambos estudios estarían comprendidos dentro del objetivo general de ampliar nuestro conocimiento sobre las interacciones existentes entre los tipos celulares foliculares.

El modelo elegido para este trabajo ha sido el ovario porcino, porque provee de un gran número de folículos de tamaño óptimo para realizar la separación de tipos celulares foliculares.

El método usado ha sido el de cultivo de corto término "in vitro" de tipos celulares foliculares aislados y en cocultivo, en presencia de distintas sustancias. La ventaja de esta técnica es que permite la determinación del potencial esteroidogénico de cada compartimiento folicular y examinar la ma

nera en que factores esteroideos y no esteroideos la regulan. Sin embargo, esta técnica presenta varias limitaciones. Aunque las células granulosas son fácilmente obtenidas en forma pura y homogénea, en el folículo, las células granulosas son avasculares, mientras que, al ser aisladas e incubadas, están expuestas a oxígeno. El tejido tecal es heterogéneo y no fácil de obtener en forma pura. Otra limitación es que, al separar estos tipos foliculares, se interrumpe la asociación estrecha existente entre estas células al formar parte del folículo. Por lo tanto, los resultados de este enfoque pueden indicar la capacidad esteroidogénica de los distintos tipos celulares foliculares pero no su verdadero rol en la esteroidogénesis folicular. Sin embargo, éste es uno de los mejores métodos disponibles actualmente para estudiar las interacciones que tienen lugar en el folículo ovárico.

2.0 MATERIALES Y METODOS.

2.1 Animales.

Se recolectaron ovarios de cerdas prepúberes inmediatamente después de su muerte en un matadero local; ovarios con cualquier indicio de ovulación fueron descartados. Para un solo experimento se obtuvieron ovarios de cerdas maduras en estadios no determinados del ciclo estral. Los ovarios se mantuvieron en Medio Esencial Mínimo modificado (MEM, ver más adelante) suplementado con buffer HEPES (20 mM) a 4° C. Folículos de tamaño mediano (diámetro = 4-6 mm) se aislaron de los ovarios, y se limpiaron cuidadosamente de tejido intersticial circundante utilizando forceps finos bajo un microscopio de disección. Aquellos folículos que presentaban señales visibles de atresia (células granulosa separadas de la pared follicular o dispersas en el antro) fueron descartados, y sólo se usaron folículos de aspecto sano.

2.2 Aislamiento de Células Tcales y Granulosas.

Los folículos se cortaron en cuartos y las células gra-

nulosas se separaron de las tecaes raspando suavemente el interior de los folículos con una varilla de vidrio, cuyo extremo había sido estirado para dar un diámetro de curvatura apropiado para el tamaño de los folículos.

Los trozos de teca se combinaron y colocaron en solución salina balanceada de Hanks, libre de magnesio y calcio, suplementada con buffer HEPES (20 mM). Se agitaron suavemente sobre un agitador magnético por 5 minutos para liberar las células granulosas remanentes, y así obtener preparaciones tecaes más limpias (95). Las células granulosas se reunieron y recolectaron por centrifugación. Se lavaron dos veces resuspendiendo en MEM modificado y centrifugando, y se resuspendieron en MEM fresco.

2.3 Condiciones Generales de Cultivo.

El medio de cultivo usado fue Medio Esencial Mínimo de Eagle (Flow Lab.), suplementado con glutamina (4 mM), aminoácidos no esenciales (0,1 mM), fungizona (2,5 ug/ml), penicilina (100 unidades/ml) y estreptomycin (100 ug/ml) (al que se refiere como MEM modificado). Los cultivos se mantuviere

ron por distintos tiempos en un incubador humidificado a 36°C bajo una atmósfera de 5 % CO₂ en aire.

Alícuotas conteniendo un número de células granulosas correspondientes a un folículo (alrededor de 5×10^5 células viables; 0,20 mg de proteína) se cultivaron en suspensión en 1 ml de medio de cultivo en tubos de cultivo (tubos plásticos estériles Falcon, 12 x 75 mm).

Cuatro trozos de teca (un folículo equivalente de tejido) se colocaron sobre rejillas de acero inoxidable en las cavidades de placas de plástico Falcon 3047 Multiwell conteniendo 1 ml de medio de cultivo, o 0,5 ml de medio fresco más 0,5 ml de medio usado por células granulosas (en el caso de determinar el efecto de las células granulosas sobre la síntesis tecal de andrógenos) o en medio de cultivo conteniendo células granulosas (en el caso de co-cultivos).

Varias sustancias, solas o en combinación, se agregaron antes del cultivo. Estas fueron: 1 ug/ml FSH (NIH-FSH-S11), 1 ug/ml LH (NIH-LH-B 8), varios esteroides exógenos (Steraloids) a distintas concentraciones, dibutiril AMP cíclico ((Bu)₂cAMP, Sigma). Los detalles de los diseños experimentales se darán en la sección de resultados.

Al final del período de cultivo, los medios de cultivo se guardaron a -20°C para determinación posterior de esteroides.

Con el objeto de determinar el contenido tisular de esteroides, alícuotas de etanol redestilado se agregaron a las cavidades de las placas de cultivo que contenían células granulosas adheridas, y las placas se agitaron para extraer los esteroides; el tejido tecal se colocó en 1 ml de etanol redestilado y se agitó por 2 minutos. Luego de centrifugar, alícuotas del extracto etanólico se secaron y redisolviéron en buffer para determinación posterior de esteroides. El pellet se usó para determinación de proteínas. En cada experimento, 2 o 3 muestras de tejido no cultivado se usaron para determinar el contenido inicial de esteroides; éste se sustrajo del contenido en tejido y medio al finalizar el cultivo para estimar la acumulación de esteroides durante el tiempo de cultivo.

Los resultados se expresaron en términos de acumulación de esteroides en medio de cultivo y tejido por miligramo de proteína o por folículo equivalente, corregido por contenido inicial tisular de esteroides. Análisis preliminar de los datos expresados por miligramo de proteína dieron resultados simi

lares a aquellos expresados por folículo, y en algunos casos se eligió esta última expresión para dar una comparación más significativa de la producción total de esteroides por cada tipo celular.

2.4 Determinación de Esteroides.

Se determinaron esteroides en alícuotas del medio de cultivo sin extraer, y en extractos etanólicos del tejido (evaporados y resuspendidos en buffer) por radioinmunoensayo. Para cada esteroide se verificó la validez del ensayo directo del medio de cultivo comparando los valores obtenidos por este método con los obtenidos luego de extracción de las mismas muestras con éter.

El radioinmunoensayo de Δ^7 -androstenediona (Δ^4 A) fue realizado según la técnica descrita por Leung y Armstrong (42). El anticuerpo se produjo en conejos usando 11α -hidroxi-androst-4-en-3,17-diona-hemisuccinil-albúmina sérica bovina. [$1, 2, 6, 7$ ^3H] -androstenediona se obtuvo de New England Nuclear (Boston, Massachusetts, USA). El título dando alrededor de 50 % de unión cuando 15.000 cpm de trazador eran usados, fue de 1:2.000. El rango de la curva standard fue de 12,5-

800 pg. El coeficiente de variación intraensayo fue de 3,3 % (n= 36). El coeficiente de variación interensayo fue de 11,7% (en 26 ensayos). El paralelismo se determinó ensayando androstenediona en distintas alícuotas de extracto etanólico de ovarios de rata. La regresión de la dosis en el tamaño de la alícuota se describió como $Y = 1,886 \pm 0,058 x - 27,966$, siendo el coeficiente de regresión significativamente distinto de cero.

Las alícuotas deseadas de muestras se llevaron a 100 μ l con buffer fosfo-salino (PBS) pH 6,8 con 10 % de gelatina. Luego se agregaron 100 μ l de trazador (10.000-15.000 cpm) y 100 μ l de anticuerpo a todos los tubos. Luego de incubar por 8 - 20 horas a 4°C se agregó 1 ml de una suspensión de 25 % carbón - 2,5 % dextrán en PBS. Los tubos se mantuvieron a 4°C por 15 minutos y se centrifugaron a 1.200 g por 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se decantaron en viales a los que se agregó 5 ml de solución de centelleo. La radioactividad se determinó en un contador de centelleo líquido.

Los radioinmunoensayos para testosterona (T), progesterona (P), 17 β -estradiol (E₂) y estrona se realizaron con antisueros altamente específicos. Estos ensayos fueron validados previamente en el laboratorio (41, 96). Las reacciones cruzadas de los anticuerpos empleados se muestran en la Tabla I.

TABLA I

Reacciones cruzadas de algunos esteroides con los anticuerpos utilizados.

<u>Anticuerpo anti- Δ^4-androstenediona</u>		<u>Anticuerpo anti-testosterona</u>	
<u>Esteroides</u>	<u>% reacción cruzada</u>	<u>Esteroides</u>	<u>% reacción cruzada</u>
Δ^4 -Androstenediona	100,00	Testosterona	100,00
5 α -Androstano-3,17-diona	5,00	DHT	53,00
Testosterona	2,00	5 α -Androstano-3 α , 17 β -diol.	30,00
Otros Esteroides	< 1,00	5 α -Androstano-3 β , 17 β -diol	13,00
		Δ^4 -Androstenediona	< 0,04

<u>Anticuerpo anti-Progesterona</u>		<u>Anticuerpo anti-Pregnenolona</u>	
<u>Esteroides</u>	<u>% reacción cruzada</u>	<u>Esteroides</u>	<u>% reacción cruzada</u>
Progesterona	100,00	Pregnenolona	100,00
5 β -pregnano-3,20-diona	9,20	5-Pregnen-3 β , 20 α -diol	25,00
5 α -pregnano-3,20-diona	8,60	5-Pregnen-3 β , 20 β -diol	8,30
5 α -pregnano-3 β ol-20-ona	2,60	Progesterona	0,60
Pregnenolona	0,80	17 β -Estradiol	< 0,20
otros esteroides	< 0,10		

<u>Anticuerpo anti-17β-Estradiol</u>	
<u>Esteroides</u>	<u>% reacción cruzada</u>
17 β -Estradiol	100,00
Estrona	3,00
Testosterona	< 0,02
Progesterona	< 0,01

El porcentaje de reacción cruzada para cada uno de los esteroides probados fue calculado como la relación entre la masa de esteroide necesaria para producir un desplazamiento del 50 % en la curva, con respecto a la masa de esteroide en estudio necesario para producir el mismo desplazamiento.

El anticuerpo contra testosterona da 50 % de reacción cruzada con DHT, y las estimaciones de niveles de testosterona pueden entonces incluir DHT.

El anticuerpo contra pregnenolona, preparado en conejos contra el conjugado de albúmina sérica bovina al 16 α - carboxi-etil tioéter de pregnenolona, fue donado por el Dr. G. Niswender y el ensayo fue realizado como el descrito por Ingba y col. (97), excepto que se ensayaron alícuotas de medio sin extraer. La validez del ensayo directo se verificó comparando valores obtenidos para cantidades conocidas de esteroide en medio de cultivo y en buffer fosfato; los valores estaban significativamente correlacionados ($r = 0,99$ y $y = 0,05 \pm 0,91 x$)

Para determinar la contribución de otros metabolitos presentes en el medio de cultivo a la pregnenolona medida en este ensayo, pregnenolona fue aislada de algunas muestras por cromatografía en columna. Alícuotas de las muestras se extrajeron tres veces con 3 volúmenes de éter dietílico. Se prepara

ron columnas de LH-20 y se corrieron usando como solvente heptano : benceno : metanol (85:10:5) (98). La recuperación del esteroide se determinó agregando (^3H) -pregnenolona antes de la extracción con éter. La fracción de pregnenolona se ensayó por radioinmunoensayo de alícuotas del extracto etéreo.

En los ensayos de los distintos esteroides se incluyeron alícuotas de las distintas sustancias presentes en los cultivos para determinar su reacción cruzada con los anticuerpos utilizados.

2.5 Determinación de Proteínas.

Finalizados los cultivos, las células granulosas se incubaron en 1 ml de NaOH 0,1N por 16 horas a temperatura ambiente. El contenido de proteínas se determinó por el método de Lowry y col. (99) usando albúmina sérica bovina (0-150 μg disueltos en agua) como standard.

A alícuotas de 0,3 ml se agregaron 3 ml de solución alcalina de cobre (1 ml de $\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 % en tartrato de sodio y potasio 1 % + 49 ml de Na_2CO_3 2 % en NaOH 0,1N). Los tubos se agitaron y dejaron 10 minutos a temperatura am-

biente. Luego se agregaron 0,3 ml de reactivo de Folin Ciocalteu 2N (Fisher Scientific Company) diluido 1:1 con agua. Se agitó inmediatamente y luego de una hora a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 660 nm.

Las preparaciones tecales se hirvieron por 30 minutos en 1 ml de NaOH 1N. La determinación de proteínas se realizó de la manera descrita para las células granulosas excepto que se usó Na_2CO_3 2% en agua y la curva standard se preparó en NaOH 1N.

2.6 Extracción de Esteroides de Medio de Cultivo.

50 mg de carbón (Norit A, Fisher Scientific Company) y 0,5 mg de dextrán (T 70, Pharmacia Fine Chemicals) se agregaron a 1 ml de medio de cultivo. Luego de incubar por 15 minutos a 4°C, el medio se centrifugó a 1200 g por 15 minutos. Este procedimiento se repitió 2 veces y el sobrenadante se filtró. La efectividad de este procedimiento para eliminar esteroides del medio se confirmó por radioinmunoensayo de alícuotas del medio extraído.

2.7 Estudio del Metabolismo de Andr6genos.

2.7.1. Condiciones de Cultivo.

C6lulas granulosas, preparaciones tecales y co-cultivos se incubaron con $4,4 \times 10^{-9}$ M (1, 2, 6, 7 3 H) -andros-tenediona (New England Nuclear, 114 Ci/mmol) o $3,7 \times 10^{-9}$ M (1, 2, 6, 7, 16, 17 3 H) -testosterona (New England Nuclear, 135 Ci/mmol) en MEM modificado por 24 hs a 36° C bajo una atm6sfera de 5 % CO_2 en aire. La cantidad de esteroide agregado correspondi6 en masa al contenido inicial de andr6geno (Δ^4 A o T) del tejido tecal. Los blancos para cada experimento consistieron de 1 ml de medio de cultivo conteniendo el sus-trato radioactivo, en ausencia de tejido.

Finalizados los cultivos, los esteroides se extrajeron del medio 3 veces con 3 vol6menes de 6ter diet6lico. En algunos casos, los esteroides se extrajeron del tejido con etanol. Esto no se realiz6 sistem6ticamente ya que menos del 8 % de la radioactividad inicial se encontraba en el tejido al final del cultivo.

La fase acuosa remanente luego de la extracci6n del medio de cultivo con 6ter se trat6 con 10 vol6menes de etanol

redistilado para precipitar las proteínas. Luego de centrifugar, el pellet se descartó; el etanol se eliminó del sobrenadante por evaporación, y el residuo, disuelto en agua, se sometió a cromatografía en DEAE-Sephadex.

2.7.2. Preparación de las columnas de DEAE-Sephadex.

Se mezcló Sephadex A₂₅ (tamaño de partícula: 40-120 micrones, Pharmacia Ltd., Montreal, Canadá) con agua bi-distilada en una proporción de 10 gramos por 150 ml. Esta mezcla se agitó por lo menos 6 veces, a intervalos; cada vez se dejó que se depositase por 30 minutos, se aspiró el sobrenadante y se reemplazó con agua antes de volver a agitar.

Se utilizaron columnas de Sephadex (K 9/60) de diámetro interno (D.I.) de 0,9 cm (Pharmacia Ltd.). En el extremo inferior de las columnas se colocó un trozo de tubo de goma que se cerró con una llave de salida, y la columna se llenó hasta 4-5 cm del borde superior con agua. Se fue agregando cuidadosamente la suspensión de gel. Cuando el extremo superior estaba libre de A₂₅, el agua se eliminaba con pipeta Pasteur y se reemplazaba con un volumen similar de la suspen-

sión. Esto se repitió hasta que la mitad de la columna se llenara con gel sedimentado. Luego se abrió la llave y se permitió que el líquido fluyera libremente, agregando continuamente suspensión hasta obtener una altura de columna de 58 cm.

2.7.3 Cromatografía en DEAE-Sephadex A 25.

Las cromatografías se realizaron a temperatura ambiente según la técnica descrita por Hobkirk y Nilsen (100). Las muestras, disueltas en 2 ml de agua, fueron aplicadas cuidadosamente con pipeta Pasteur. El tubo que había contenido la muestra se lavó varias veces con 2-3 ml de agua, y esto también se agregó a la columna. La columna se conectó a un sistema de gradiente compuesto por dos frascos idénticos de 1000 ml conectados entre sí por un trozo de tubo de polietileno y uno de ellos, el frasco mezclador, agitado magnéticamente. De este último, un tubo llevaba el eluyente a la columna. El sistema de gradiente utilizado contenía 500 ml de agua en el frasco mezclador y 500 ml de Na Cl 0,8 M en el envase donor. Se dejó que la columna fluyera libremente bajo 50 cm de solución eluyente. Fracciones de eluido de 10 ml se recolectaron

y la radioactividad se determinó en alícuotas por espectrometría de centelleo líquido.

2.7.4 Hidrólisis de Sulfatos de Esteroides.

Los conjugados fueron extraídos de solución saturada de NaCl, 3 veces con 3 volúmenes de acetato de etilo. Se agregó sulfato de sodio anhidro y, luego de filtrar, el acetato de etilo fue evaporado. Al residuo se agregaron 0,25 ml de metanol y 1 ml de ácido acético glacial: acetato de etilo (1:9) y se incubó 16 hs a 50°C (101). Luego de evaporar completamente, el residuo fue resuspendido en 2 ml de agua y extraído 3 veces con 3 volúmenes de éter dietílico.

2.7.5 Cromatografía en Capa Delgada.

Las muestras, disueltas en el menor volumen de benceno: metanol (1:1), fueron sembradas en placas de vidrio recubiertas con gel de sílica (GF 254, Brinkmann; 0,25 mm de espesor). Esteroides conocidos apropiados fueron sembrados en bandas adyacentes. Las corridas fueron realizadas a 4°C en el

sistema cloruro de metileno : éter dietílico (5:2), como descrito por Armstrong y col. (102). Los esteroides standard conocidos se localizaron por fluorescencia ultravioleta o por exposición a vapores de yodo.

Al final de la corrida, bandas de 1 centímetro fueron raspadas de las placas y eluidas con etanol. La radioactividad fue determinada en alícuotas del eluido con un contador de centelleo líquido.

Todos los esteroides radioactivos utilizados en los distintos estudios descritos en esta tesis fueron purificados mediante esta técnica antes de su uso.

2.7.6 Cromatografía Líquida de Alta Presión.

Se utilizó un equipo adquirido de Waters Associates (Canadá). El sistema de distribución de solvente consistió de dos bombas modelo 6000 A. Las muestras fueron inyectadas mediante un inyector universal modelo U6K o un procesador de muestra modelo 710B. Los detectores usados fueron un monitor de longitud de onda ultravioleta variable modelo 450, un detector ultravioleta modelo 441 o un refractómetro modelo R401.

La velocidad de flujo y la composición de solvente fueron controladas por un controlador de sistema modelo 770. Las alturas y áreas de los picos y los tiempos de retención se midieron por un data module modelo 730. Las columnas usadas fueron C₁₈U Bondapak (longitud = 30 cm; D.l.= 3,9 mm); tamaño de partícula = 10 μ), C₁₈ Radial Pak cartridge (longitud = 10 cm; D.l.= 5 mm; tamaño de partícula = 10 μ), con un módulo de compresión radial RCM-100 o microporasil (longitud = 30 cm; D.l.= 3,9 mm).

Como fases móviles se usaron mezclas binarias de solvente: agua-acetonitrilo, agua-metanol y cloroformo-isooctano, degasificados bajo presión reducida o por inmersión en un baño ultrasónico por 20 minutos. Las velocidades de flujo usadas fueron de 1,5 ml/min para la columna C₁₈ U Bondapak, 1 ml/min para el C₁₈ radial cartridge y 3 ml/min para la columna de microporasil.

Debido a la pequeña cantidad de masa presente en las muestras a analizar, sus tiempos de retención se determinaron evaluando la radioactividad en alícuotas de las fracciones obtenidas.

2.7.7 Reducción con Borohidruro de Sodio.

Al esteroide disuelto en 0,5 ml de isopropanol se agregaron 25 mg de borohidruro de sodio. Luego de incubar por una hora a temperatura ambiente, la reacción se detuvo agregando 2 ml de metanol. Los productos de reacción se evaporaron, resuspendieron en 2 ml de agua y extrajeron tres veces con 3 volúmenes de éter dietílico.

2.7.8 Oxidación con el Reactivo de Jones.

El reactivo se preparó disolviendo 26,72 gramos de trióxido de cromo en 23 ml de ácido sulfúrico concentrado llevado a 100 ml con agua.

Al esteroide se agregaron 2 ml de acetona y 15 μ l del reactivo de Jones. La reacción se realizó a 12-14°C por 4 minutos con agitación constante. Se agregó 1 ml de metanol para detener la reacción, y se evaporó. El residuo fue resuspendido en agua y extraído con 3 volúmenes de éter dietílico.

2.7.9 Determinación de la Actividad de Sulfotransferasa.

Se siguió la técnica descrita por Sturm y Hannapel (82). Células granulosas o preparaciones tecales fueron homogeneizadas en 5 volúmenes de buffer Tris HCl (0,1M; pH 7,4) con 0,25 M de sucrosa. El homogenato se centrifugó a 100.000 g por 60 minutos.

La mezcla de incubación consistió en Tris HCl 0,1 M conteniendo 1,4 umol de ATP, 2,8 umol de Mg Cl₂ y 7 umol de K₂SO₄. La reacción se realizó a 37° C por 2 horas en presencia de alícuotas del sobrenadante de 100.000 g y de distintos esteroides radioactivos como sustratos (New England Nuclear). En algunos casos se agregó (³⁵S)-Na₂SO₄ (New England Nuclear). La reacción se detuvo sumergiendo los tubos en un baño a 4°C.

El esteroide libre se separó de la mezcla de reacción por extracción con éter dietílico.

Los blancos consistieron en tubos conteniendo la mezcla de incubación y el sustrato radioactivo.

Como control se usó el sobrenadante de 100.000 g de homogenatos de hígado de rata.

2.8 Efecto de Testosterona sobre la utilización de Progesterona por Células Granulosas.

Células granulosas se cultivaron por distintos tiempos con 1 μ g/ ml de FSH (NIH-FSH-SII) y (4 - 14 C) -progesterona 10^{-6} M (New England Nuclear, 50 mCi/mmol) en presencia o ausencia de testosterona (5×10^{-6} M). Finalizado el cultivo, los esteroides se extrajeron del medio de cultivo con éter dietílico. El extracto etéreo se evaporó bajo nitrógeno seco y el residuo se redisolvió en benceno: metanol (1:1). Esto se sometió a cromatografía en capa delgada en el sistema descrito anteriormente, agregándose 25 μ g de progesterona a las muestras como standard interno. Luego de la corrida, la banda correspondiente a progesterona, ubicada por fluorescencia ultravioleta, se raspó de las placas y se eluyó con etanol. El eluido se evaporó y su radioactividad fue determinada. El sustrato radioactivo utilizado se sometió al mismo procedimiento; la cantidad de radioactividad recuperada en ambos casos fue comparada, calculándose de esta manera la desaparición de progesterona.

2.9 Análisis de los Resultados.

La existencia de diferencias significativas en la acumulación de esteroides en respuesta a los distintos tratamientos se determinó mediante técnicas standard de análisis de varianza (103). Cuando la prueba de Bartlett reveló heterogeneidad de varianza entre los valores no transformados, los análisis se realizaron sobre los valores transformados logarítmicamente. Sin embargo, para uniformidad en la presentación, los resultados se presentan usando valores no transformados. En el caso de usarse porcentajes, los análisis se realizaron sobre valores transformados angularmente.

La prueba de rangos múltiples de Duncan se utilizó para comparaciones específicas entre valores medios.

El efecto de medio usado por células granulosas y de esteroides sobre la síntesis tecal de andrógenos se analizó mediante la prueba no paramétrica de Friedman (104) debido a considerable heterogeneidad de varianza de muchos valores.

3.0 RESULTADOS

3.1 Rol de las Células Granulosas en la Síntesis de Andrógenos.

3.1.1 Efecto de Medio Usado por Células Granulosas sobre la Síntesis Tecal de Andrógenos.

Células granulosas fueron cultivadas por 24 hs sin hormonas exógenas (A) o con FSH (B). Al final del período de incubación los medios de cultivo se congelaron para ser usados posteriormente en cultivos tecales.

Las preparaciones tecales fueron cultivadas en 1 ml de medio fresco o 0,5 ml de medio fresco más 0,5 ml de medio en que células granulosas habían sido cultivadas previamente (medio usado A y B) en presencia o ausencia de LH. Al finalizar el período de cultivo se determinaron esteroides en medio de cultivo y proteínas en tejido. Este procedimiento se repitió en 7 experimentos distintos con 6 replicados por tratamiento en cada uno. Debido a la variabilidad observada en las cantidades de testosterona y Δ^4 -androstenediona producidas por los

cultivos control en cada experimento, los resultados se expresaron como porciento de los cultivos control. Los resultados combinados de siete experimentos están representados en las figuras 3 y 4. A pesar de las diferencias en valores absolutos obtenidos en los distintos experimentos, los efectos de los distintos tratamientos fueron consistentes en cada experimento, y las diferencias entre experimentos desaparecieron cuando los resultados se expresaron como porciento de valores control.

LH significativamente estimuló de 2 a 4 veces la acumulación de testosterona y Δ^4 -androstenediona.

Células granulosas aisladas de los mismos folículos secretaron cantidades muy pequeñas de ambos andrógenos durante las 24 hs de cultivo (datos no representados).

En ausencia de LH, la cantidad total de andrógenos (Δ^4 A y T) sintetizados dependió del medio presente en la incubación ($P < 0,01$). En cambio, el medio no afectó la síntesis de andrógenos estimulada por LH. La producción de andrógenos por preparaciones tecales cultivadas en presencia de medio usado control (M_A) no fue significativamente distinta de los controles ($P < 0,05$). Sin embargo, medio en que células granulosas habían sido cultivadas en presencia de FSH (M_B) causó

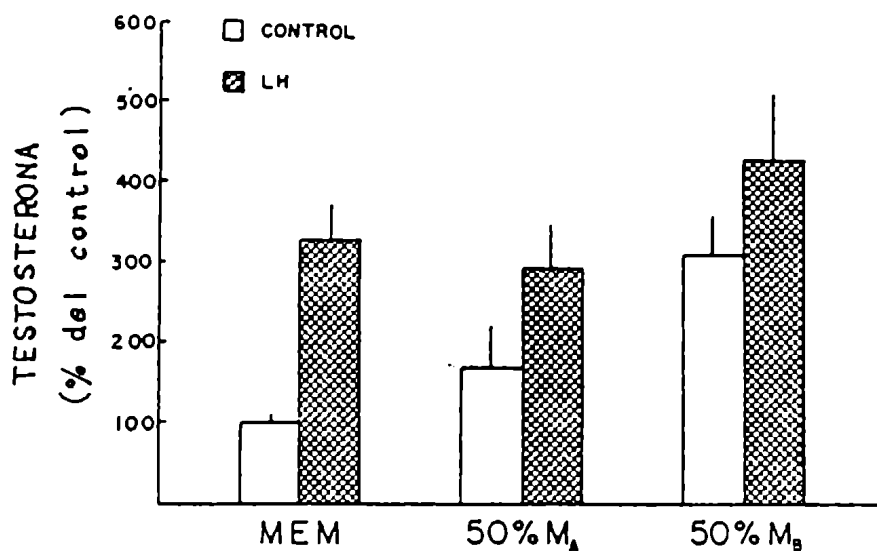


Figura 3: Efecto de medio usado por células granulosas y/o LH sobre la producción tecal de testosterona (T) en 24 hs de cultivo. Los valores representan el promedio \pm E.S. del porcentaje de cultivos control.

Abreviaturas: C, control; M_A, medio obtenido de células granulosas cultivadas en MEM; M_B, medio obtenido de células granulosas cultivadas en MEM con FSH (1 ug/ml).

(Los valores en los cultivos control fueron $10,52 \pm 2,89$; $18,32 \pm 2,90$; $4,74 \pm 0,73$; $5,85 \pm 1,35$; $12,66 \pm 5,28$; $3,92 \pm 0,56$ ng/mg proteína).

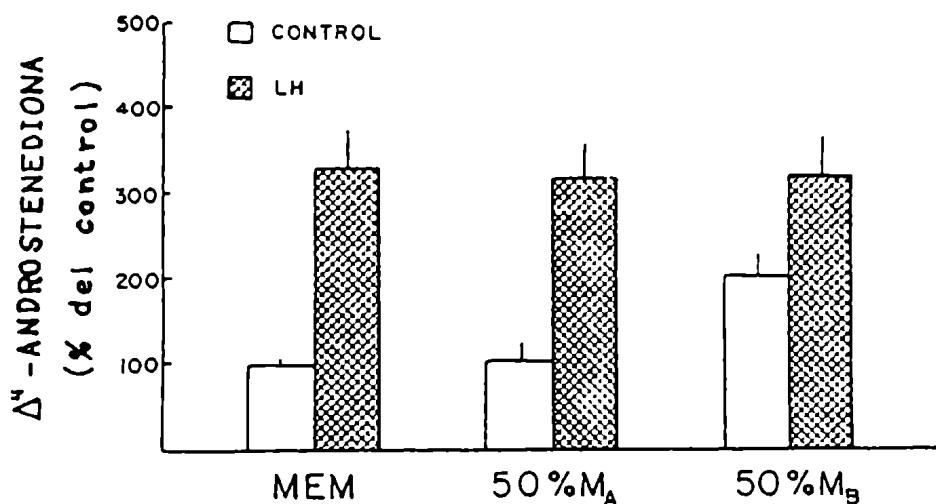


Figura 4: Efecto de medio usado por células granulosas y/o LH sobre la producción tecal de Δ^4 -androstenediona (Δ^4A) en 24 hs de cultivo. Los valores representan el promedio \pm E.S. del porciento de la cantidad de Δ^4A en los cultivos control. (Las cantidades producidas por los cultivos control fueron: $95,65 \pm 26,43$; $99,67 \pm 3,65$; $51,20 \pm 8,31$; $58,68 \pm 9,04$; $198,06 \pm 41,29$; $74,04 \pm 15,90$ ng/mg proteína).

un incremento al doble en la acumulación de Δ^4 -androstenediona y al triple en la de testosterona. Este efecto no se debe a la presencia de FSH en el medio ya que la misma cantidad de FSH no produjo efecto alguno ($P < 0,1$) sobre la síntesis de andrógenos por las mismas preparaciones tecales (Tabla II).

3.1.2. Efecto de Medio Usado Extraído con Carbón-Dextrán sobre la Síntesis Tecal de Andrógenos.

Para determinar si el efecto del medio usado por células granulosas se debía a un esteroide o a algún otro factor, el medio se extrajo con carbón-dextrán. El efecto de este medio sobre la síntesis tecal de andrógenos está representado en la figura 5. Mb estimuló significativamente la síntesis de andrógenos (Δ^4 - androstenediona más testosterona) ($P < 0,01$), mientras que Mb extraído con carbón-dextrán no afectó la síntesis tecal de andrógenos ($P < 0,5$). Ya que la extracción de medio fresco con carbón-dextrán no afectó la síntesis basal de andrógenos (100 % del control), estos resultados sugieren que la capacidad del medio usado de estimular la síntesis de andrógenos se debe a la presencia de alguna pequeña molécula.

TABLA II

Efecto de FSH sobre la síntesis tecal de andrógenos (ng/mg proteína).

	<u>4A^a</u>	<u>T^a</u>
Control	58,68 ± 9,04	5,85 ± 1,35
FSH (1 ug/ml)	64,03 ± 10,06	6,35 ± 1,51

^a Promedio ± E.S. de 6 replicados.

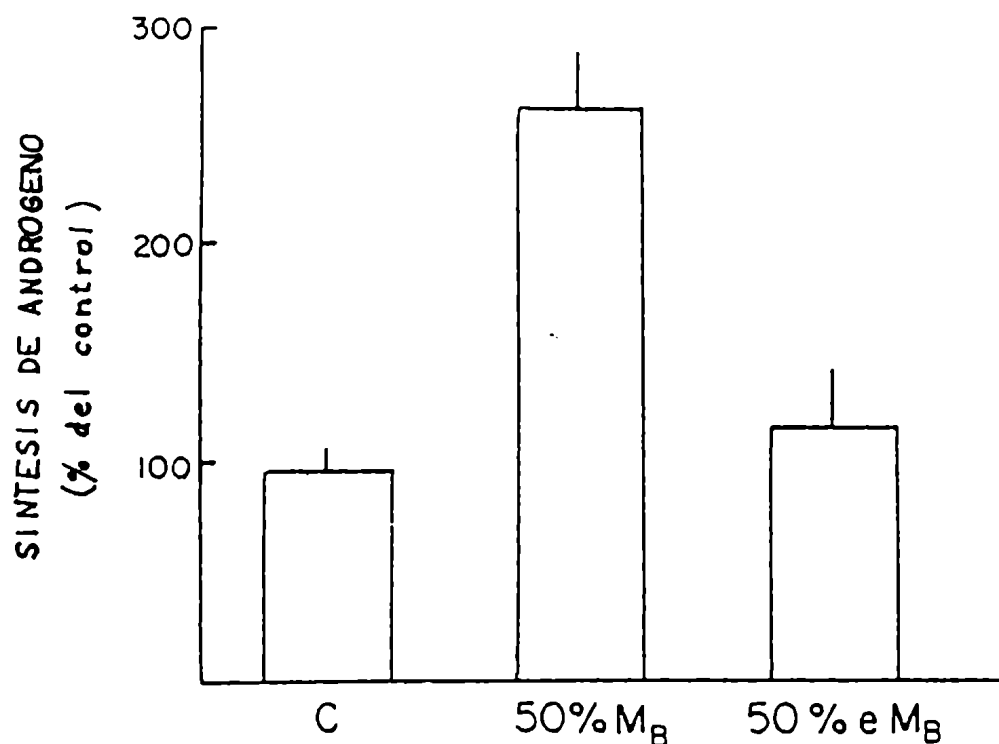


Figura 5: Efecto de la extracción con carbón-dextrán sobre la capacidad del medio usado por células granulosas de estimular la síntesis tecal de andrógenos (Δ^4 -androstenediona más testosterona). Los valores representan el promedio \pm E.S. del porcentaje de cultivos control.

Abreviaturas: e M_B, M_B extraído con carbón-dextrón.

Con el objeto de determinar si el efecto del medio usado sobre la síntesis de andrógenos se debía a la presencia de esteroides, se midieron en éste las concentraciones de sustratos posibles para la síntesis de andrógenos.

3.1.3 Concentración de Esteroides en Medio Usado por Células Granulosas.

Las concentraciones de Δ^4 -androstenediona, testosterona, pregnenolona y progesterona en los medios usados (M_A y M_B) se muestran en la Tabla III. Ambos medios contenían cantidades muy pequeñas de los andrógenos. Las concentraciones de los C_{21} -esteroides fueron mayores en el medio usado B ($P < 0,001$). El contenido de pregnenolona en ambos medios fue mucho mayor que el de progesterona ($P < 0,001$).

Debido a los valores elevados de pregnenolona obtenidos por radioinmunoensayo, se decidió determinar si otros metabolitos producidos por las células granulosas estarían interfiriendo en el ensayo. Alícuotas de 10 muestras fueron extraídas con éter dietílico y pregnenolona fue aislada por cromatografía de los extractos en columnas de LH-20. La Tabla IV com

TABLA III

Concentración de algunos esteroides en medio usado por células granulosas (ng/0,5 ml).

<u>Medio</u>	<u>$\Delta^4\text{A}$</u>	<u>T^a</u>	<u>Pregnenolona</u>	<u>Progesterona</u>
M _A	ND	0,09 \pm 0,02	41,04 \pm 2,21	3,77 \pm 0,62
M _B	ND	0,15 \pm 0,03	86,51 \pm 5,89	27,35 \pm 3,81

^a Promedio \pm E.S. de 16 muestras.

Abreviaturas:

M_A: medio obtenido de células granulosas cultivadas en MEM.

M_B: medio obtenido de células granulosas cultivadas en MEM
con 1 ug/ml FSH.

ND: no detectable.

TABLA IV

Concentración de pregnenolona (ng/ml, n=5) antes y después de purificación del medio de cultivo por cromatografía en columnas de LH-20.

<u>Preparación de la muestra</u>	<u>Control</u>	<u>FSH</u>
Medio no extraído(X)	46,96 ± 6,68	112,87 ± 11,40
Extracto etéreo cromatografiado en LH-20 (Y)*	53,48 ± 14,25	116,76 ± 37,14

$$Y = 41,36 \pm 0,45 X \quad r = 0,916$$

* corregido por recuperación de esteroides de las columnas.

para la cantidad de pregnenolona inmunoreactiva obtenida por ensayo directo con la obtenida luego de extracción y cromatografía. Tanto en cultivos control como en aquellos tratados con FSH, la estimación del contenido de pregnenolona obtenida luego de cromatografía fue similar a la obtenida por radioinmunoensayo directo del medio de cultivo.

3.1.4 Efecto de C₂₁-Esteroides sobre la Síntesis Tecal de Andrógenos.

Se examinó la capacidad de pregnenolona y progesterona exógenas de incrementar la síntesis tecal de andrógenos. Preparaciones tecales fueron incubadas por 24 horas en presencia de 0-200 ng de pregnenolona o progesterona. Los resultados combinados de dos experimentos distintos con 5 replicados por dosis en cada uno están representados en las Figuras 6 y 7. Aunque progesterona estimuló significativamente la producción de Δ^4 -androstenediona ($P < 0,001$) y de testosterona ($P < 0,001$), los niveles presentes en el medio usado (Tabla III) parecen ser insuficientes para causar un incremento en la síntesis de andrógenos.

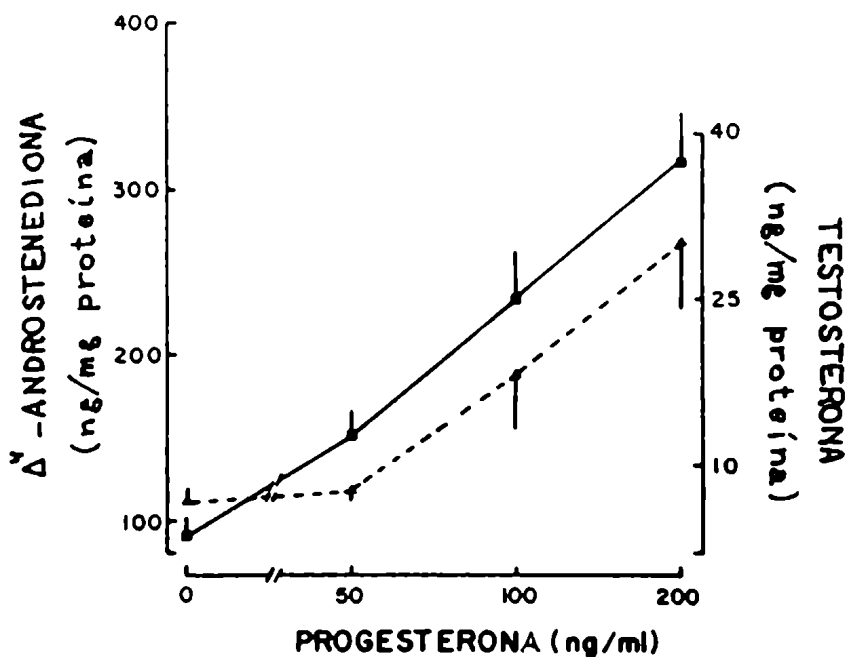


Figura 6: Curva de dosis respuesta de cultivos tecales a progesterona. Cada punto representa el promedio \pm E.S. de 9 incubaciones.

(—■— , Δ^4 A; - -▲- - , T)

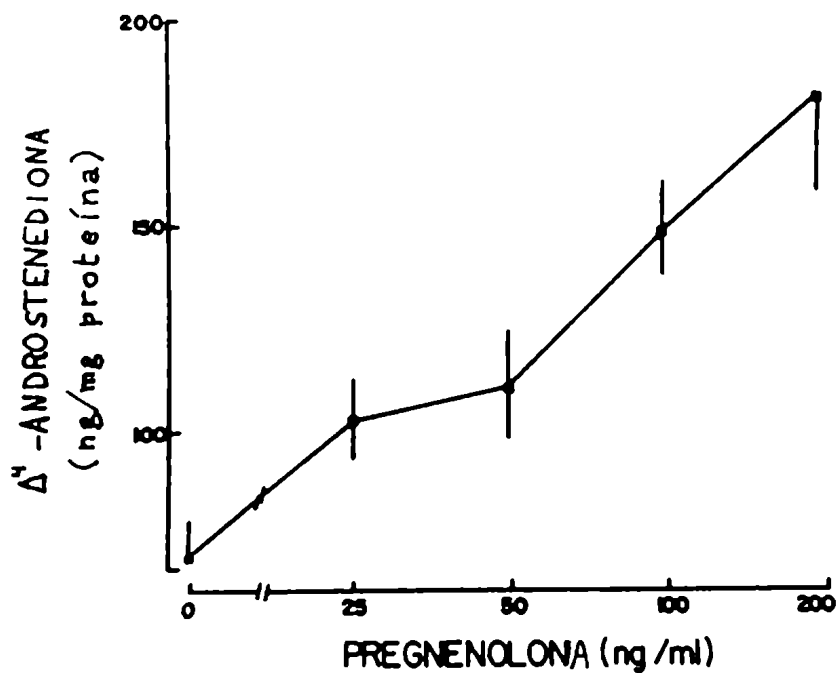


Figura 7: Curva de dosis respuesta de cultivos tecales a pregnenolona. Cada punto representa el promedio \pm E.S. de 9 incubaciones.

Pregnenolona, desde concentraciones tan bajas como 25 ng por cultivo, estimuló significativamente ($P < 0,001$) la síntesis tecal de Δ^4 - androstenediona. En presencia de pregnenolona, la producción de testosterona fue variable. Sin embargo, dado que testosterona representa sólo 10 % de la cantidad de andrógeno total (Δ^4 A más T) acumulada en los cultivos tecales, los niveles presentes en MB parecen ser suficientes para provocar un incremento al doble en la síntesis total de andrógenos.

Aunque el término "andrógeno total" usado incluye androstenediona, testosterona y DHT (ya que el RIA usado no distingue entre estos dos últimos compuestos), se reconoce que otros andrógenos, como los 5 α -androstanedioles y androsterona, también podrían ser producidos en cantidades significativas.

3.2 Rol de las Células Granulosas en el Metabolismo de Andrógenos.

3.2.1. Capacidades Relativas de los Tipos Celulares Foliculares para Sintetizar Andrógenos y Estrógenos.

Células tecales y granulosas derivadas de folículos

ováricos de cerdas prepúberes se separaron y cultivaron, aisladas o en recombinación, por 24 horas. La cantidad de esteroides sintetizada en cultivo por folículo equivalente por los distintos tipos celulares está representada en la Figura 8. Las células granulosas produjeron cantidades no detectables de todos los esteroides determinados.

Las preparaciones tecales sintetizaron grandes cantidades de andrógenos, predominantemente Δ^4 -androstenediona, siendo la relación de Δ^4 -androstenediona a testosterona semejante a 10. La producción de 17β -estradiol por la teca fue escasa.

La acumulación de Δ^4 -androstenediona en los co-cultivos fue mucho menor ($P < 0,001$) que en los cultivos tecales. La acumulación de testosterona no difirió significativamente ($P > 0,05$) entre co-cultivos y cultivos tecales. Si bien los co-cultivos produjeron 3 veces más 17β -estradiol que las preparaciones tecales, la cantidad total de andrógenos (Δ^4A más T) y 17β -estradiol siguió siendo menor en los co-cultivos que en los cultivos tecales. También se determinó estrona en algunas muestras pero ésta sólo representó alrededor del 15 % de la producción total de estrógenos (estrona + E_2). La inclusión de FSH (1 ug/ml) en los co-cultivos no produjo efecto alguno

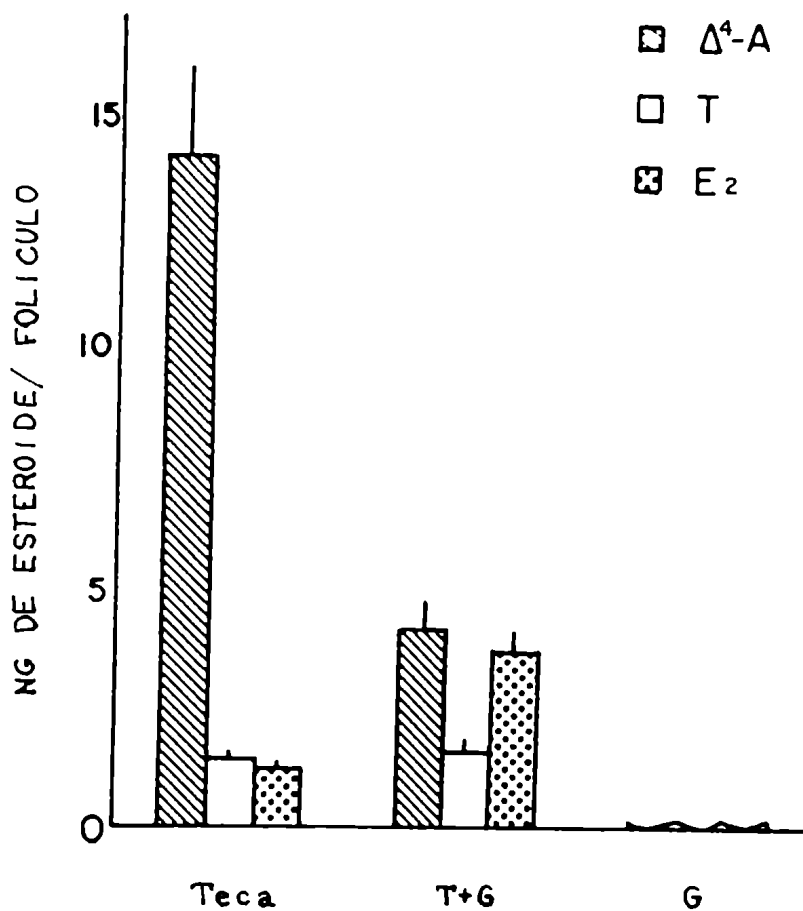


Figura 8: Síntesis de Δ^4 -androstenediona (Δ^4 A), testosterona (T) y 17 β -estradiol (E_2) por células tecales y granulosas porcinas, aisladas y en recombinación, en 24 hs de cultivo. Cada barra representa el promedio \pm E.S. de los resultados de 5 experimentos distintos con 6 replicados cada uno. Síntesis se refiere a la cantidad de esteroide medida en tejido y medio al final del período de cultivo menos la cantidad medida en el tejido no incubado.

sobre la acumulación de Δ^4 A y T (datos no mostrados).

3.2.2 Capacidades Relativas de los Tipos Celulares Foliculares para Metabolizar Andrógenos.

Dado que anteriormente se observó que adición de medio en que células granulosas habían sido cultivadas estimulaba la síntesis tecal de andrógenos, la observación de un efecto inhibitorio al co-cultivar células granulosas con preparaciones tecales sugirió que las células granulosas probablemente metabolizaban el andrógeno tecal a otros productos. Para examinar esta posibilidad, los distintos tipos celulares foliculares fueron cultivados en presencia de testosterona o Δ^4 -androstenediona radioactivas, purificadas por cromatografía en capa delgada. Al final del período de cultivo, los esteroides se extrajeron a éter dietílico para caracterización posterior. Inesperadamente, la radioactividad adicionada a los cultivos no pudo ser recuperada totalmente en los extractos etéreos en todos los casos. Más aún, los porcentajes de radioactividad extraíbles al éter (esteroides libres) dependieron del tejido presente en las incubaciones ($P < 0,001$). Los porcentajes de radio

actividad recuperada se muestran en la Tabla V. La mayor parte de la radioactividad en los cultivos tecales pudo ser extraída con éter. Sin embargo, siempre que los cultivos contuvieran células granulosa, más del 50 % de la radioactividad inicial permaneció en la fase acuosa, no habiendo diferencia alguna entre los cultivos de células granulosa aisladas y los co-cultivos. En vista de estos resultados se planteó la posibilidad de que las células granulosa fueran capaces de formar conjugados de esteroides, solubles en agua.

Al cultivar células granulosa con dehidroepiandrosterona radioactiva, sólo 11 % de la radioactividad permaneció en la fase acuosa, mientras que al agregar androsterona o DHT radioactivas, toda la radioactividad fue recuperada en el extracto etéreo.

3.2.3 Metabolismo de Andrógenos por Células Granulosas.

Para obtener mayor evidencia de conjugación de esteroides y determinar qué tipo de conjugados se formaban, se estudió el metabolismo de (^3H) - Δ^4 -androstenediona por células granulosa. En 18 experimentos distintos, $60,4 \pm 2,2$ % de

TABLA V

Porcentajes de radioactividad extraíble al éter luego de cultivo con (^3H)-androstenediona o (^3H)-testosterona por 24 horas.

<u>Tipo Celular</u>	Cultivos con <u>(^3H)-Androstenediona</u> ^a	Cultivos con <u>(^3H)-Testosterona</u> ^b
Teca	60,6 \pm 4,5	90,9 \pm 8,0
Granulosa	24,1 \pm 1,2	38,5 \pm 1,4
Teca + Granulosa	21,3 \pm 1,0	41,8 \pm 5,9

^a Los valores representan el promedio \pm E.S. de 10 replicados.

^b Los valores representan el promedio \pm E.S. de 5 replicados .

la radioactividad inicial permaneció en la fase acuosa luego de extracción con éter dietílico. La fracción acuosa fue examinada por cromatografía en DEAE-Sephadex. La Figura 9 representa el perfil de elución observado en un experimento representativo. $57,52 \pm 4,05$ % ($n = 18$) de la radioactividad en la fase acuosa eluyó en una posición similar del gradiente (Pico II, Figura 9). La Figura 10 representa el perfil de elución observado al cromatografiar en este sistema varios monosulfatos de esteroides neutros y esteroides libres. Es evidente que el principal metabolito de androstenediona no corresponde con testosterona - 17-monosulfato o con androsterona-3 - monosulfato.

El material presente en las fracciones 4-5 (Pico I, Figura 9) fue completamente extraído al éter. Luego de solvolisis, 98 % de la radioactividad en las fracciones 15-19 (Pico II, Figura 9) pudo ser extraído con éter, sugiriendo que 60 % de la fracción acuosa probablemente consistía de C19-esteroides neutros conjugados a iones sulfato.

3.2.4 Actividad de Sulfotransferasa en Células Granulosas.

Se realizaron ensayos de actividad de sulfotransferasa

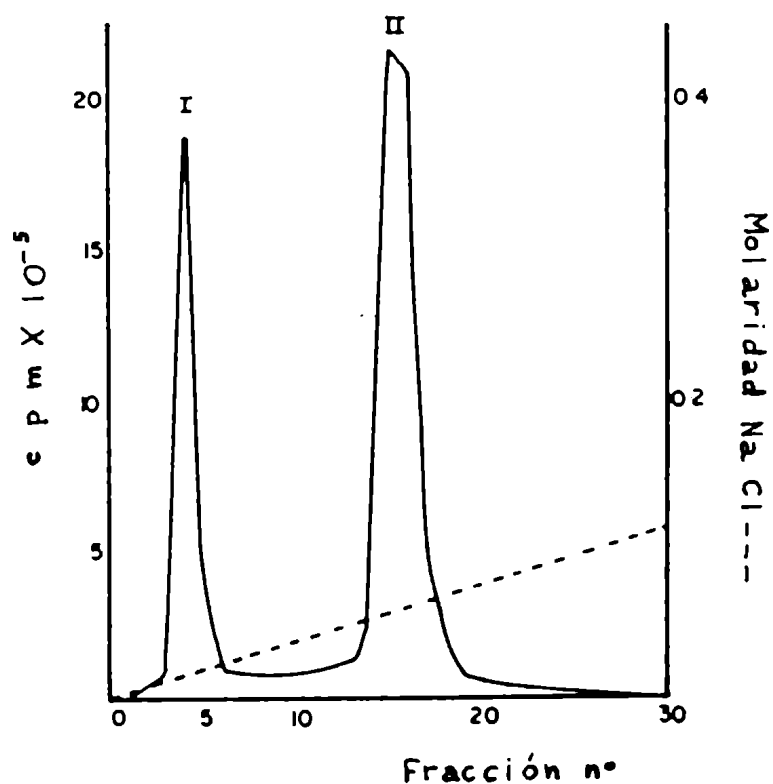


Figura 9: Perfil de elución de cromatografía en DEAE-Sephadex de la fracción acuosa obtenida de células granulosa cultivadas en presencia de (³H)- Δ^4 -androstenediona en un gradiente lineal de NaCl (0-0,8 M).

Pico I: esteroides libres - Pico II: sulfatos de esteroides -
El volumen de cada fracción fue de 9,5 ml.

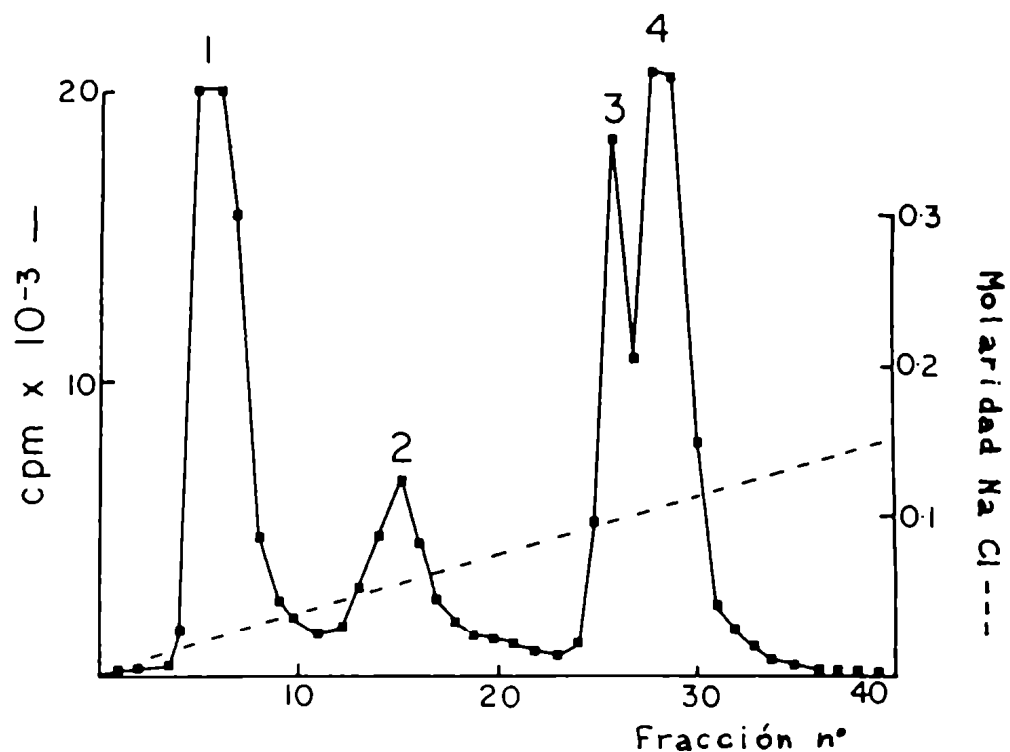


Figura 10: Perfil de elución de cromatografía en DEAE-Sephadex en un gradiente lineal (0-0,8 M NaCl) de: pico 1, DHEA; pico 2, sulfato de testosterona; pico 3, sulfato de DHEA; pico 4, sulfato de androsterona.

El volumen de cada fracción fue de 10 ml.

con el objeto de obtener evidencia independiente de formación de sulfatos de andrógenos por células granulosas. La Figura 11 representa el perfil de elución en DEAE-Sephadex A25 del producto de reacción obtenido al incubar sobrenadante de 100000 g de células granulosas con (^3H) -androsterona, en presencia de (^{35}S) - Na_2SO_4 , previa eliminación del sustrato en exceso por extracción con éter dietílico. Se observa que ^{35}S y ^3H eluyeron en la porción del gradiente correspondiente a androsterona-3-monosulfato, siendo la relación entre ^{35}S y ^3H constante (parte superior de Figura 11). Estos resultados fueron repetidos dos veces con el mismo sobrenadante de 100000 g. Sin embargo, sobrenadantes obtenidos de distintos lotes de células granulosas sólo conjugaron cantidades pequeñas de androsterona, aunque algunos de ellos conjugaron testosterona. La inconsistencia de estos resultados sugiere que la capacidad de conjugar estos andrógenos no es uniforme en todos los folículos, o que las condiciones óptimas para el ensayo enzimático en tejido ovárico porcino difieren de aquellas para otros tejidos estudiados.

3.2.5 Estudios Tendientes a la Identificación de los Metabolitos Conjugados por las Células Granulosas.

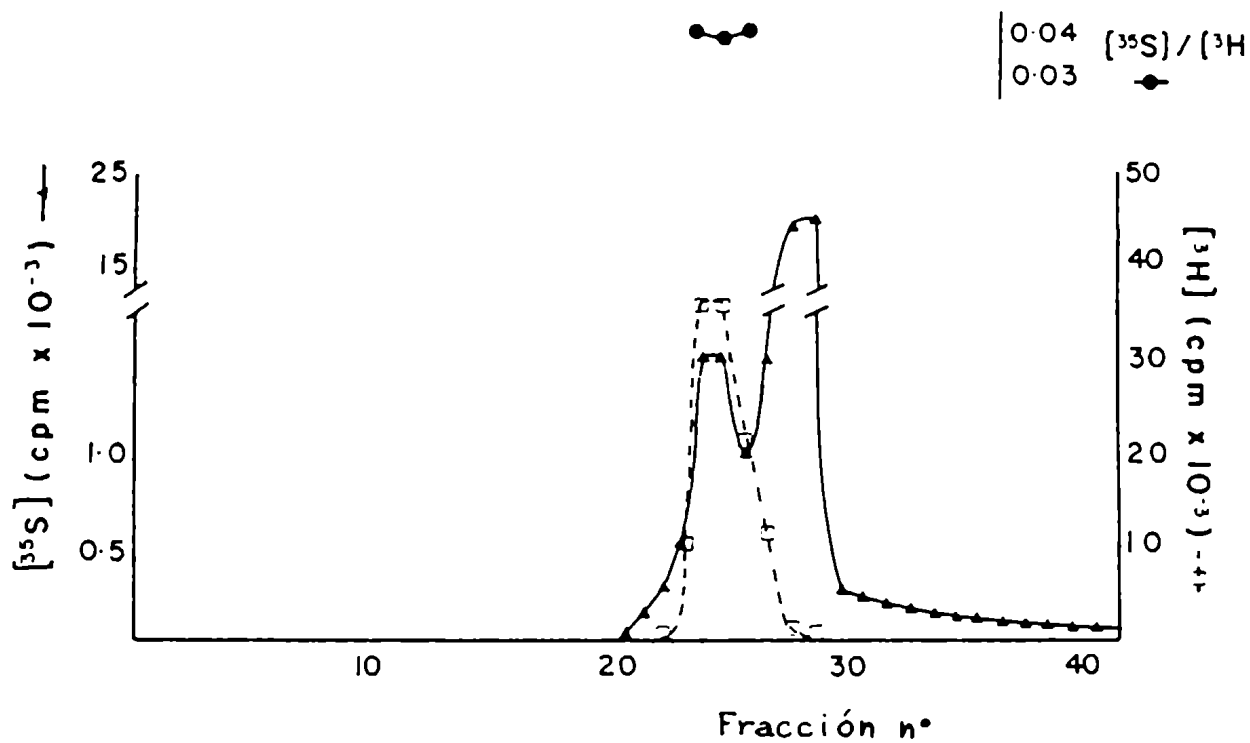


Figura 11: Perfil de elución de cromatografía en DEAE-Sephadex de los productos del ensayo enzimático de sulfotransferasa en un gradiente lineal de Na Cl (0-0,8 M).

Los sustratos fueron: (^3H)-androsterona y (^{35}S)- Na_2SO_4 .

El volumen de cada fracción fue de 9 ml.

Se realizaron estudios para determinar la identidad de los esteroides conjugados al cultivar células granulosas en presencia de Δ^4 -androstenediona. En la Figura 12 se muestra el camino de metabolismo de andrógenos que supuestamente se sigue en el ovario, en base a resultados obtenidos en la rata (105, 106). Se llevaron a cabo estudios preliminares tendientes a encontrar un sistema que permitiera una buena separación de estos compuestos. El método elegido fue cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se obtuvo una buena separación de estos compuestos usando una columna de microporasil (fase normal) con el sistema cloroformo:isooctano (6:4) (Figura 13). El perfil de elución obtenido al cromatografiar en este sistema al producto de solvólisis junto a otros esteroides carrier está representado en la Figura 14. El pico radioactivo eluyó con un tiempo de retención de 1,26-1,40 relativo a Δ^4 -androstenediona. La anchura del pico se debe probablemente a que el sustrato usado (Δ^4 A) consiste de una población de isótopos. En efecto, este sistema es capaz de resolver isótopos de un trazador, como se ejemplifica en la Figura 15 para testosterona radioactiva purificada. Alternativamente, el pico podría contener varios compuestos, no resueltos por este sistema.

En la Tabla VI se da una lista de los esteroides cromatografiados.

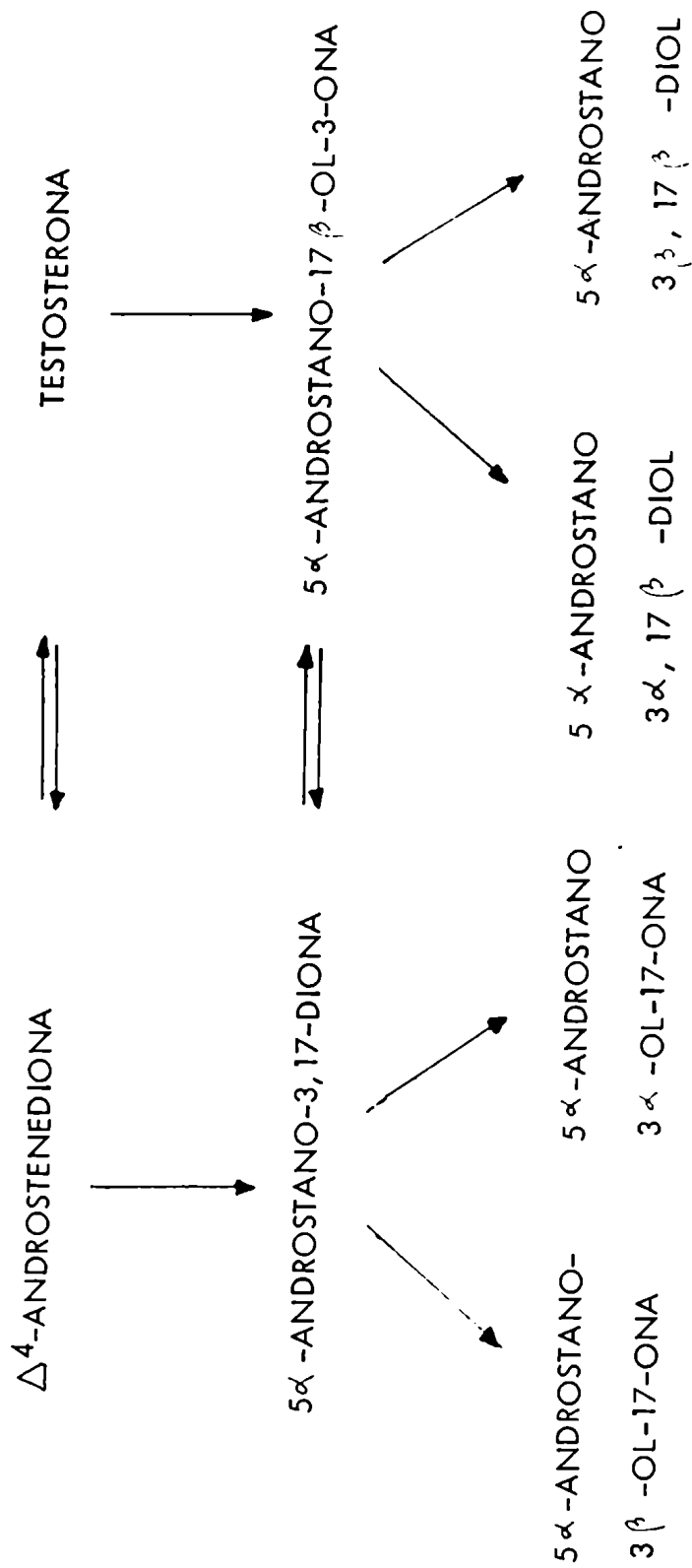


FIGURA 12: Caminos para el metabolismo de andrógenos.

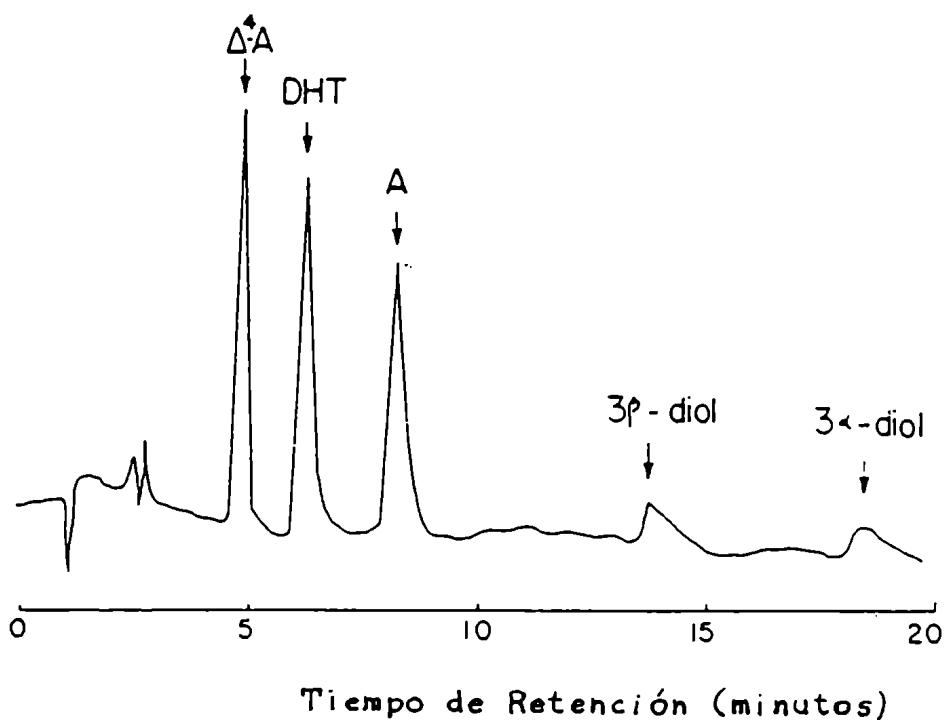


Figura 13: Perfil de elución del cromatógrafo líquido de alta presión mostrando los índices de refracción relativos para Δ^4 -androstenediona (Δ^4A), dihidrotestosterona (DHT), androsterona (A), 5α -androstan- 3β , 17β -diol (3β -diol) y 5α -androstan- 3α , 17β -diol (3α -diol). Los esteroides fueron separados en una columna de microporasil y el sistema de solventes cloroformo: isooctano :: 6:4; 3 ml/min.

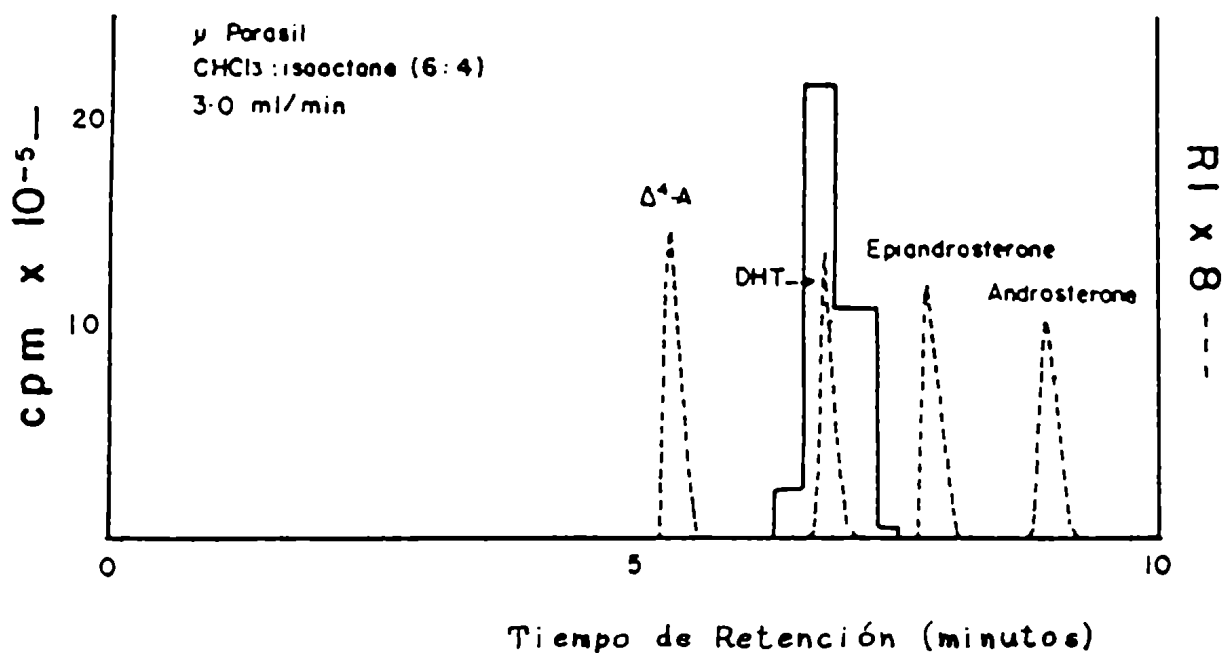


Figura 14: Separación por HPLC de los productos de solvólisis de la fracción de monosulfato neutro en una columna de microporasil y el sistema de solventes cloroformo: isooctano :: 6 : 4, 3 ml/min.

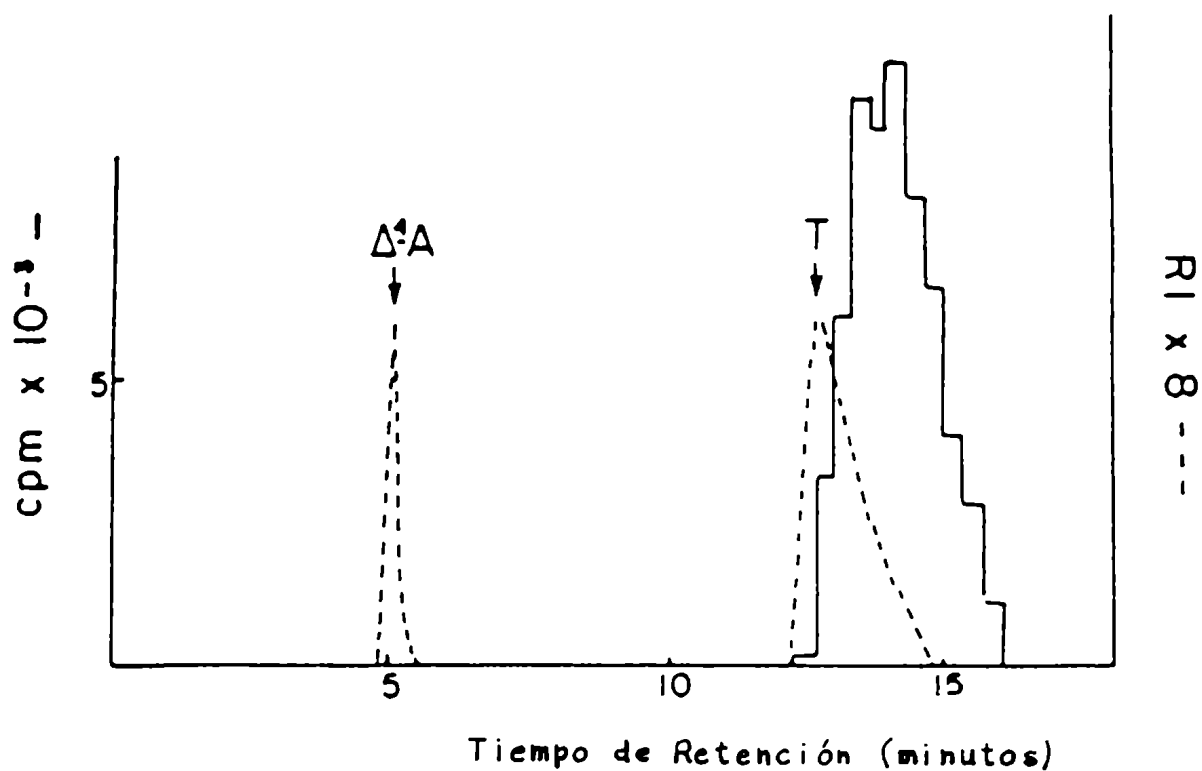


Figura 15: Separación por HPLC de isótopos de (^3H)-testosterona.

(1, 2, 6, 7, 16, 17 ^3H)-Testosterona y testosterona no radioactiva fueron cromatografiados en una columna de microporasil con el sistema de solventes cloroformo: isooctano :: 6 : 4; 3 ml/min.

TABLA VI

Tiempos de retención relativos de algunos esteroides de 19 átomos de carbono en HPLC (columna μ Porasil; CHCl_3 : isooctano :: 6 : 4; 3 ml/min).

<u>Esteroides</u>	<u>Tiempo de Retención</u> <u>Relativo a Androstenediona = 1</u>
Compuesto desconocido	1,26-1,40
5 α -Dihidrotestosterona (DHT)	1,28
Epiandrosterona	1,45
Androsterona	1,67
Testosterona	2,68
5 α -Androstano-3 β ,17 β -diol	2,80
Etiocolanolona	3,04
5 α -Androstano-3 α ,17 β -diol	3,73
5 α -Androst-16-en-3 α -ol	0,59
5 α -Androstano-3,17-diona	0,57
5 α -Androst-16-en-3-ona	0,55

Tiempo de retención de Δ^4 -Androstenediona = 5 minutos.

tografiados en este sistema con sus tiempos de retención en el mismo. Aquellos esteroides con tiempos de retención semejantes al compuesto desconocido (DHT, epiandrosterona, androsterona) fueron descartados por datos de recristalización. Al oxidar este compuesto por el método de Jones, y someterlo a cromatografía en este sistema, la radioactividad eluyó con un tiempo de retención semejante a Δ^4 -androstenediona. La identidad del producto de reacción fue confirmada por recristalización con $[^{14}\text{C}]-\Delta^4$ -androstenediona a relación $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ constante.

La reducción con borohidruro de sodio dio lugar a dos compuestos que se comportaron como dioles en este sistema. Esto sugiere que el compuesto es un esteroide no saturado con una función ceto y un hidroxilo.

Aunque el metabolito representó aproximadamente 40% del producto solvolizado en los dos primeros lotes de células examinadas, otros lotes produjeron cantidades mucho menores de este compuesto. Se decidió entonces emplear otro sistema para determinar la identidad de los metabolitos producidos al incubar células granulosa con Δ^4 -androstenediona.

En la Figura 16 se ilustra el perfil de elución del producto solvolizado en una columna de fase reversa con el siste-

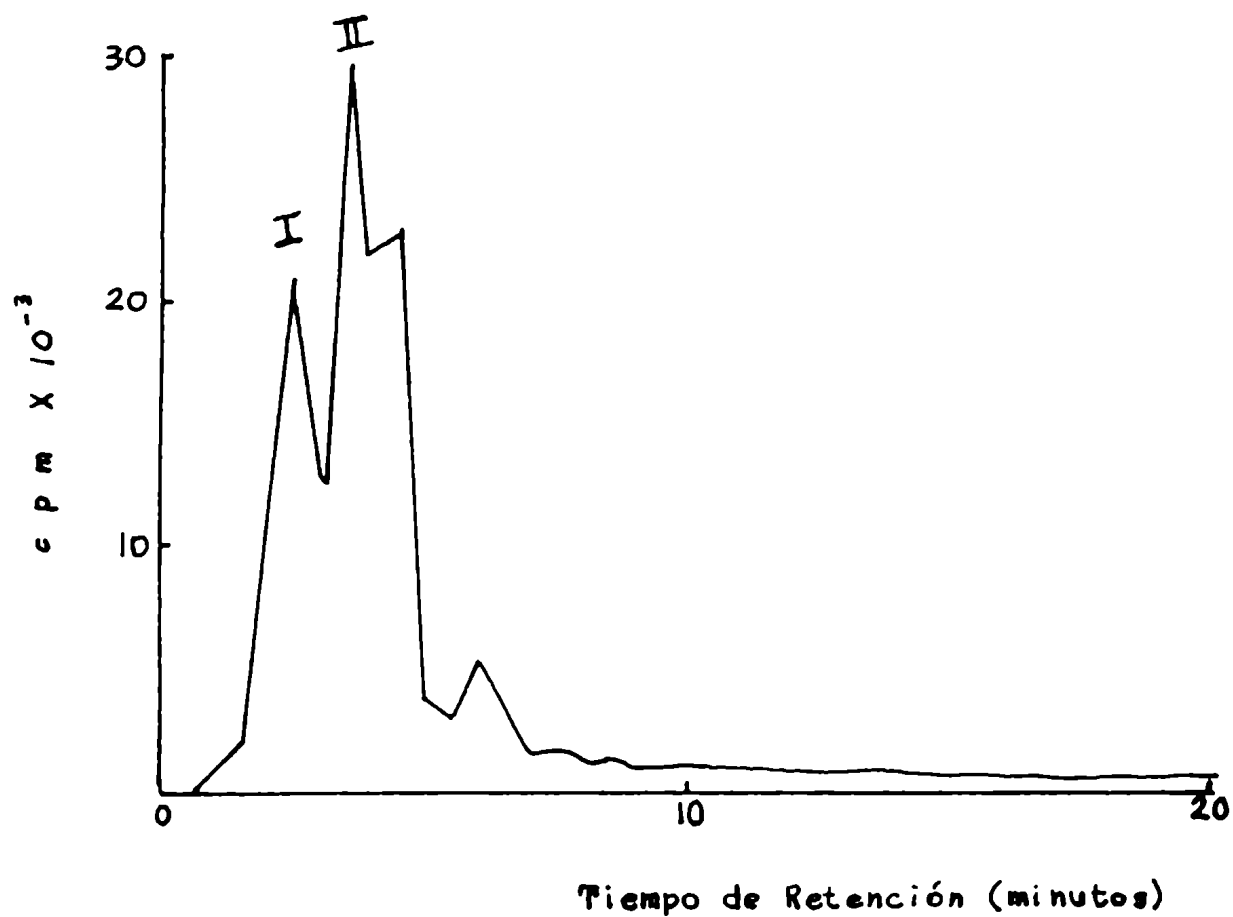


Figura 16: Separación por HPLC de los productos de solvólisis de la fracción de monosulfato neutro en una columna C₁₈ Radial Pak Cartridge y el sistema de solventes acetonitrilo : agua :: 4 : 6, 1 ml/min.

ma acetonitrilo:agua (4:6). Se observaron varios picos; el com puesto más abundante aparece con un tiempo de retención de 3,5-4,5 minutos (0,27-0,35 relativo a Δ^4 -androstenediona). Contrariamente al metabolito anterior, la presencia de este compuesto fue consistente en todas las incubaciones realizadas (16 lotes de células obtenidos en distintos días). Este producto no eluye de la columna de microporasil con el sistema de solventes usado debido a su alta polaridad.

Los tiempos de retención de varios esteroides en el sistema de fase reversa empleado se encuentran en la Tabla VII. Es evidente que en este sistema sólo 19-hidroxi-androstenediona y 19-hidroxi-testosterona presentan tiempos de retención si milares al compuesto desconocido.

El mayor pico de la Figura 16 (11, tiempo de retención= 3,5-4,0 minutos) se cromatografió luego en una columna de fase reversa con el sistema metanol:agua (6:4), presentando un tiempo de retención de 4 minutos. Bajo las mismas condiciones, 19-hidroxi-androstenediona y 19-hidroxi-testosterona eluyeron a 3,90 y 3,75 minutos respectivamente.

Al ser cromatografiado en capa delgada, el metabolito radioactivo se comportó como un compuesto muy polar, con un Rf semejante a 19-hidroxi-androstenediona standard. Sin em

TABLA VII

Tiempos de retención relativos de algunos esteroides de 19 átomos de carbono en HPLC (C₁₈ RAD. CART. 10, 5 mm I.D.; acetonitrilo: agua :: 4: 6; 1 ml/min).

<u>Esteroides</u>	<u>Tiempo de Retención</u> Relativo a Androstenediona = 1
Pico I de HPLC	0,19
Pico II de HPLC	0,27-0,35
19-Hidroxitestosterona	0,22
19-Hidroxid- Δ^4 -androstenediona	0,26
4-Androsten-3 β , 17 β -diol	0,67
Testosterona	0,81
4-Androsten-3 β , 17 α -diol	0,82
5 α -Androstano-3 β , 17 β -diol	0,85
4-Androsten-3 α , 17 β -diol	0,86
4-Androsten-3 β -ol-17-ona	0,86
5 α -Androstano-3 α , 17 β -diol	1,08
5 β -Androstan-3 β -ol-17-ona	1,14
Dihidrostestosterona (DHT)	1,21
5 β -Androstan-3 α -ol-17-ona	1,27
Androsterona	1,49
5 α -Androstano-3, 17-diona	1,51
5 α -Androst-16-en-3 α -ol	*
5 α -Androst-16-en-3 β -ol	*

* No eluido luego de 20 minutos en este sistema.

Tiempo de retención de Δ^4 -androstenediona = 12,91 minutos.

bargo, recristalización del compuesto radioactivo con 19-hidroxi-androstenediona o 19-hidroxi-testosterona indicó que no era ninguno de estos.

Por los resultados obtenidos en cromatografía en Sephadex A25, en capa delgada y de alta presión, este compuesto parece ser un hidroxi-esteroide, no saturado, no fenólico.

En este sistema, en algunas incubaciones se observó un pico a un tiempo de retención de 1,21 respecto a Δ^4 -androstenediona, que correspondía al metabolito aislado en el sistema de fase normal.

La identidad de los compuestos conjugados por las células granulosas porcinas no pudo ser determinada. Los esteroides 5α - y 3α -reducidos, que son producidos por ovarios de otras especies (105, 106) fueron descartados debido a sus tiempos de retención en los sistemas cromatográficos usados (Tablas VI y VII). El hecho de que ni androsterona ni DHT fueran conjugados por las células granulosas también sugiere que es improbable que los compuestos conjugados sean metabolitos 5α -reducidos de Δ^4 -androstenediona. Asimismo, se descartó la posibilidad de esteroides 5β -reducidos. Es improbable que sean Δ^{16} -andrógenos, formados en grandes cantidades por tejido testicular de cerdo (107) debido a su comportamiento en HPLC de fase

normal (Tabla VI) y reversa (Tabla VII). Otros estudios usando métodos físicos en cantidades mayores de este conjugado serían necesarios para elucidar sus estructuras completamente.

3.3 Efecto de la Teca sobre la Síntesis de Progesterona por las Células Granulosas.

3.3.1 Efecto de los Andrógenos sobre la Acumulación de Progesterona por Células Granulosas.

Células granulosas fueron incubadas por 24 horas en presencia de testosterona, Δ^4 -androstenediona, DHT o androsterona en combinación con o sin 1 ug de FSH. Cada andrógeno se incluyó a concentraciones de 0,5 μ M y 5 μ M. Finalizados los cultivos, se determinó la cantidad de progesterona y 17β -estradiol acumulada. Los experimentos se realizaron por lo menos 2 veces con distintos lotes de ovarios. En cada experimento, cada tratamiento se replicó 4 veces.

Experimentos preliminares indicaron que el contenido de 17β -estradiol de las células luego del cultivo estaba por debajo de los límites de detección del ensayo. Aunque el con-

tenido tisular de progesterona era más significativo (aproximadamente 25 % de la acumulación total), el contenido tisular estaba siempre altamente correlacionado con el contenido en el medio de cultivo, independientemente de la presencia de FSH o FSH y testosterona (control, $r = 0,96$; + FSH, $r = 0,99$; + FSH + T, $r = 0,99$). Por lo tanto, los resultados se expresaron en términos de acumulación de progesterona o 17β -estradiol en el medio de cultivo por folículo equivalente.

En ausencia de andrógenos, FSH consistentemente estimuló 10 veces la síntesis de progesterona. Ninguno de los andrógenos afectó significativamente la síntesis basal de progesterona; por lo tanto estos resultados no se presentan. Los efectos de los distintos andrógenos sobre la acumulación de progesterona en respuesta a FSH se presentan en las Figuras 17-20; en el caso de testosterona y Δ^4 -androstenediona, se incluyen los datos para la acumulación de 17β -estradiol; dado que los andrógenos no aromatizables, DHT y androsterona, no afectaron la acumulación de 17β -estradiol, estos datos no están graficados.

En la Figura 17 se observa que testosterona inhibió la producción de progesterona en respuesta a FSH de una manera dosis-dependiente ($P < 0,001$), mientras que la acumulación

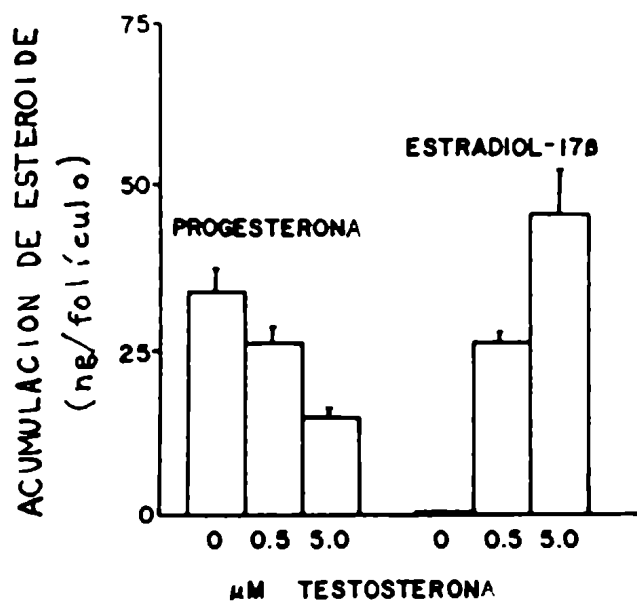


Figura 17: Efecto de testosterona sobre la acumulación de progesterona y 17β -estradiol por células granulosas en cultivo en presencia de 1 ug/ml de FSH (n= 14).

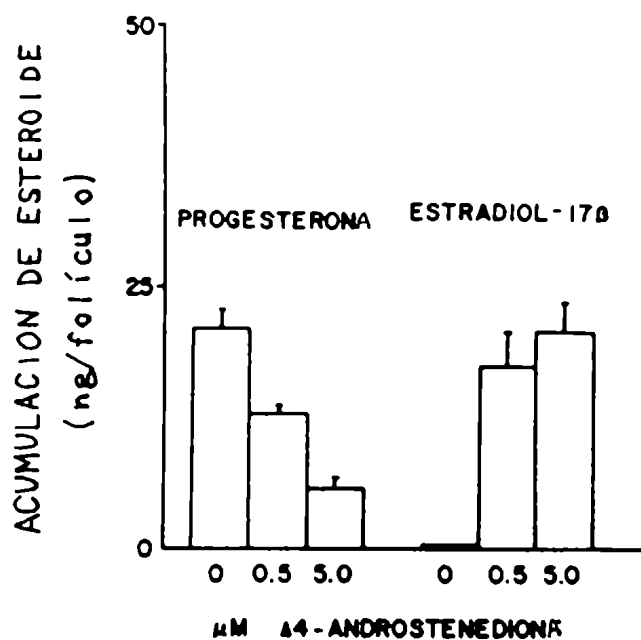


Figura 18: Efecto de Δ^4 -androstenediona sobre la acumulación de progesterona y 17β -estradiol por células granulosas en cultivo en presencia de 1 ug/ml de FSH (n= 12).

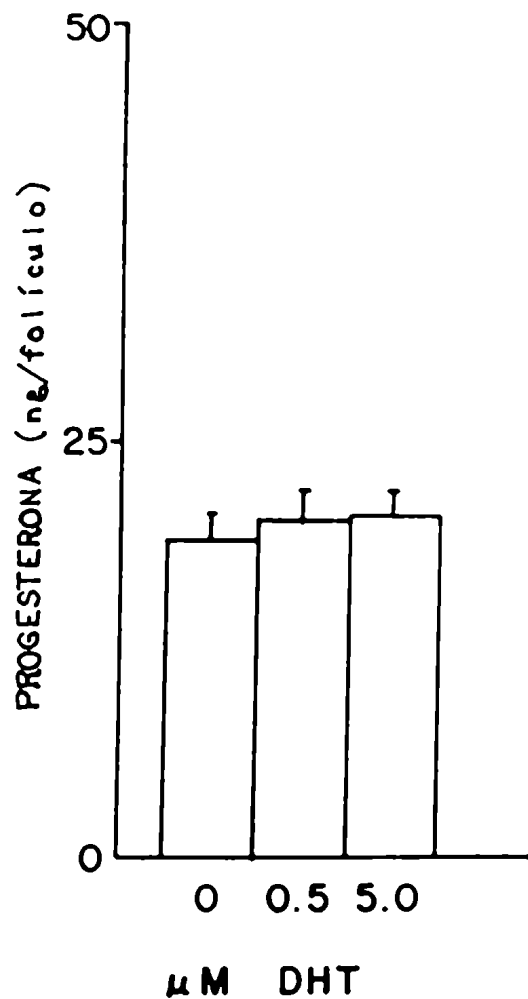


Figura 19: Efecto de dihidrotestosterona (DHT) sobre la acumulación de progesterona por células granulosas en cultivo en presencia de 1 ug/ml de FSH (n = 10).

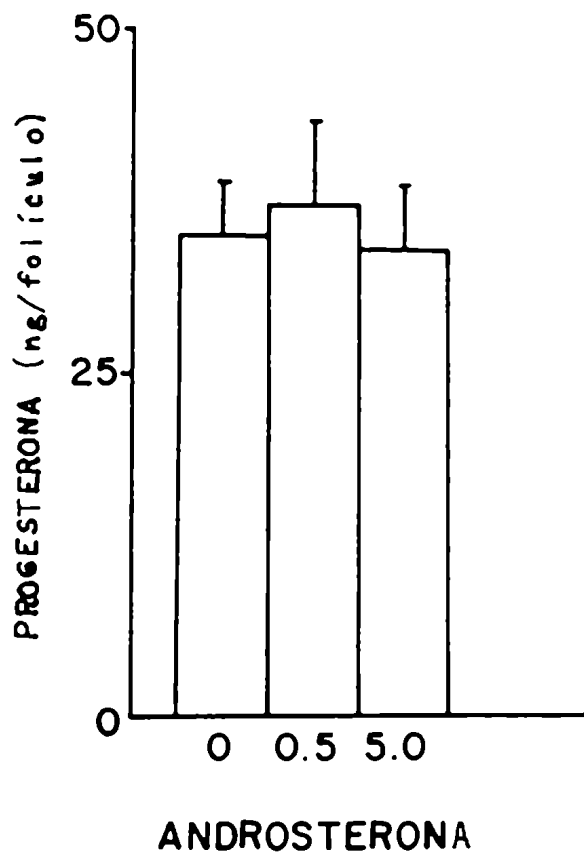


Figura 20: Efecto de androsterona (A) sobre la acumulación de progesterona por células granulosas en cultivo en presencia de 1 ug/ml de FSH (n = 8).

de 17β -estradiol aumentó al incluirse testosterona en los cultivos ($P < 0,001$). Similarmente, Δ^4 -androstenediona inhibió la acumulación de progesterona en respuesta a FSH ($P < 0,001$) y aumentó la de 17β -estradiol ($P < 0,001$) (Figura 18). DHT (Figura 19) y androsterona (Figura 20) no produjeron efecto alguno sobre la acumulación de progesterona estimulada por FSH.

El efecto de testosterona sobre la síntesis de progesterona en presencia de FSH en células granulosas aisladas de ovarios de cerdas maduras se presenta en la Tabla VIII; también en este caso testosterona inhibió significativamente ($P < 0,05$) la síntesis de progesterona en respuesta a FSH.

3.3.2 Efecto de Testosterona sobre el Metabolismo de Progesterona.

Con el objeto de determinar si testosterona causaba una reducción en la acumulación de progesterona estimulada por FSH mediante la inhibición de la síntesis de progesterona o la estimulación de su metabolismo, células granulosas fueron incubadas en presencia de (^{14}C) -progesterona (1 μ M) y FSH, con o sin testosterona (5 μ M). Luego de un período de 24 horas

TABLA VIII

Acumulación de progesterona (ng/folículo equivalente) por células granulosas obtenidas de folículos de tamaño mediano de cerdas sexualmente maduras en 24 hs de cultivo (n=4).

	<u>Progesterona</u>
control	4,5 ± 0,2 ^a
FSH	36,9 ± 7,5 ^b
FSH + 0,5 μM T	20,9 ± 4,7 ^c
FSH + 5 μM T	6,8 ± 0,5 ^a

* Las diferencias entre a y b, a y c, y, b y c fueron significativas a $P < 0,05$ (Prueba de rangos múltiples de Duncan).

de cultivo, el porcentaje de recuperación de la radioactividad inicial asociado con progesterona fue de $43,1 \pm 10,1$ % ($n=3$) en presencia de testosterona, no significativamente distinto de los controles sin testosterona ($30,9 \pm 5,2$ %, $n=3$). Esto sugiere que testosterona no estimula el metabolismo de progesterona, y por lo tanto ejercería su efecto sobre la acumulación de progesterona inhibiendo su síntesis.

3.3.3 Efecto de 17β -Estradiol sobre la Síntesis de Progesterona.

Dado que los andrógenos aromatizables podrían ejercer su efecto inhibitorio sobre la acumulación de progesterona por vía de su conversión a 17β -estradiol, fue importante determinar si estradiol inhibía la síntesis de progesterona en este sistema. Por lo tanto se incluyó estradiol en los cultivos a concentraciones de $0,5\mu\text{M}$ y $5\mu\text{M}$. Como se observa en la Figura 21, la acumulación de progesterona en respuesta a FSH disminuyó en presencia de 17β -estradiol ($P < 0,001$), confirmando que estradiol es inhibitorio a estas concentraciones.

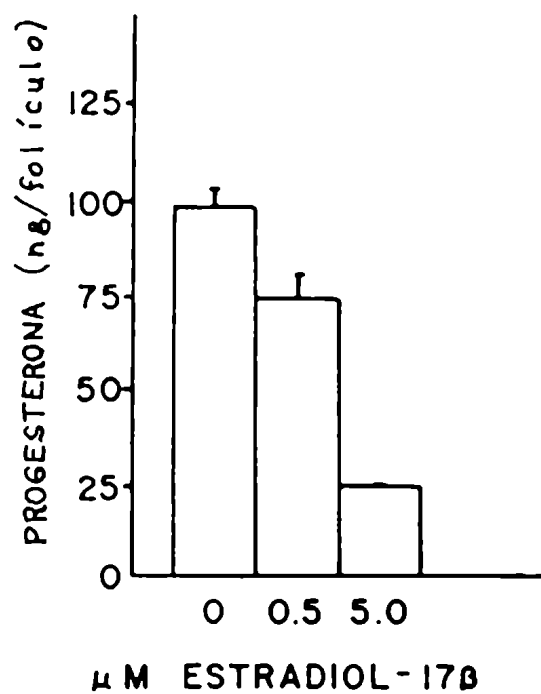


Figura 21: Efecto de 17 β -estradiol sobre la acumulación de progesterona por células granulosas en cultivo en presencia de 1 ug/ml de FSH (n = 8).

3.4 Mecanismo por el cual los Andr6genos Inhiben la S3ntesis de Progesterona por C3lulas Granulosas en Respuesta a FSH.

3.4.1. Relaci3n Temporal entre la Acumulaci3n de Progesterona y 17 β -Estradiol en Cultivo en Presencia de FSH y Testosterona.

C3lulas granulosas fueron cultivadas en presencia de FSH solo o FSH y testosterona (5uM). Los cultivos se interrumpieron a las 4, 8, 16 o 24 horas. La acumulaci3n de progesterona est3 representada en la Figura 22 y la de estradiol en la Figura 23. Los datos se analizaron por an3lisis de varianza en dos direcciones. Los niveles de progesterona ($P < 0,001$) y de 17 β -estradiol ($P < 0,001$) aumentaron con tiempo en cultivo. En presencia de testosterona, la acumulaci3n de progesterona fue inhibida al nivel de $P < 0,05$ a todos los tiempos estudiados (Prueba de rangos m3ltiples de Duncan) y, similarmente, la acumulaci3n de 17 β -estradiol estuvo significativamente elevada ($P < 0,05$) a todos los tiempos estudiados. En ausencia de testosterona, la acumulaci3n de progesterona aument3 marcadamente entre 4 y 8 horas de cultivo, pero, en presencia de testosterona, no aument3 sustancialmente hasta despu3s de 8 horas

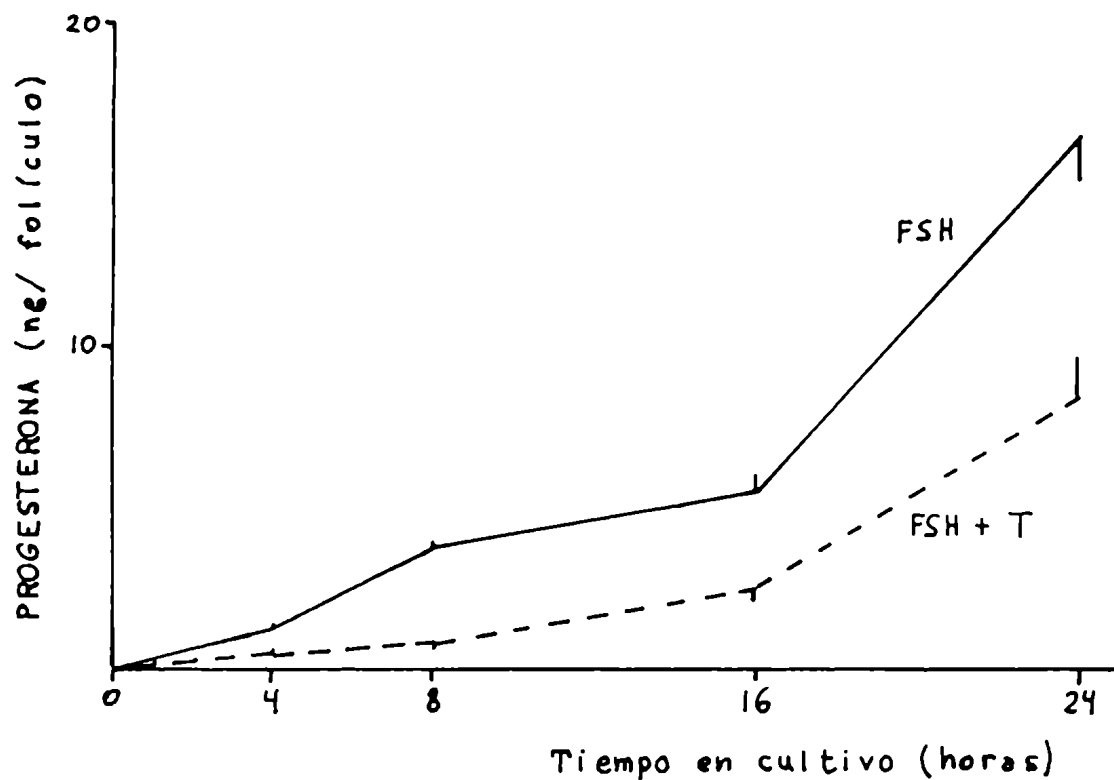


Figura 22: Curva de tiempo para la acumulación de progesterona por células granulosas en cultivo. El medio contenía un folículo equivalente de células, 1 ug/ml de FSH, y ningún esteroide (línea entera) o testosterona 5 uM (línea quebrada)(n=4).

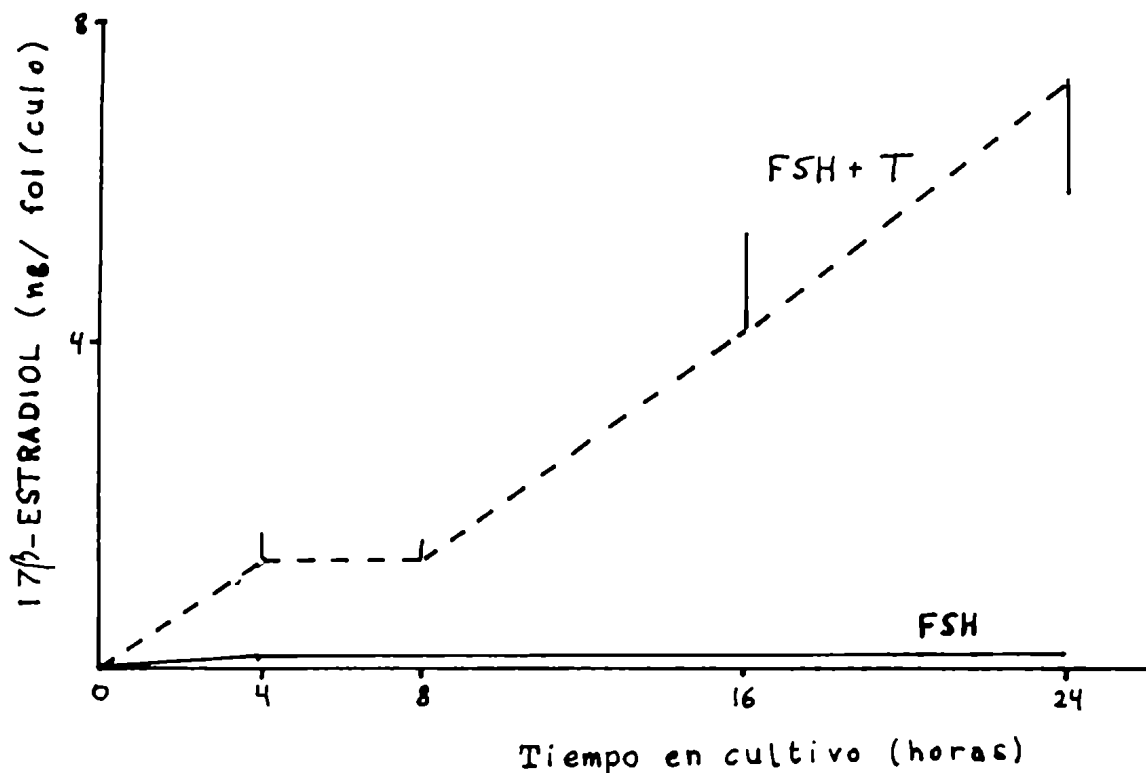


Figura 23: Curva de tiempo para la acumulación de 17 β -estra_ddiol por células granulosas en cultivo. El medio contenía un fo_lículo equivalente de células, 1 ug/ml de FSH, y ningún esteroi_de (línea entera) o testosterona 5 uM (línea quebrada) (n = 4).

en cultivo. En presencia de testosterona, la acumulación de 17β -estradiol no se alteró entre las 4 y 8 horas de cultivo y no aumentó notablemente hasta después de las 8 horas. Es decir que la acumulación de progesterona fue inhibida por testosterona antes de un aumento sustancial en los niveles de estradiol.

3.4.2 Efecto de un Inhibidor de la Aromatasa sobre la Inhibición de la Síntesis de Progesterona por Testosterona.

Para obtener mayor evidencia de que el efecto inhibitorio sobre la acumulación de progesterona era causado por testosterona misma, sin previa conversión a 17β -estradiol, células granulosas fueron cultivadas en presencia de FSH, con o sin testosterona (0,5 uM y 5 uM) y con o sin 1 ug de 4-acetoxi-4-androsten-3,17-diona (4 a A). Este último es un inhibidor efectivo de la aromatasa (108). Los resultados están representados en las Figuras 24 (acumulación de progesterona) y 25 (acumulación de 17β -estradiol). Análisis de varianza en dos direcciones demostró que testosterona promovía la acumulación de estradiol ($P < 0,001$) y que 4 a A la inhibía efectivamente

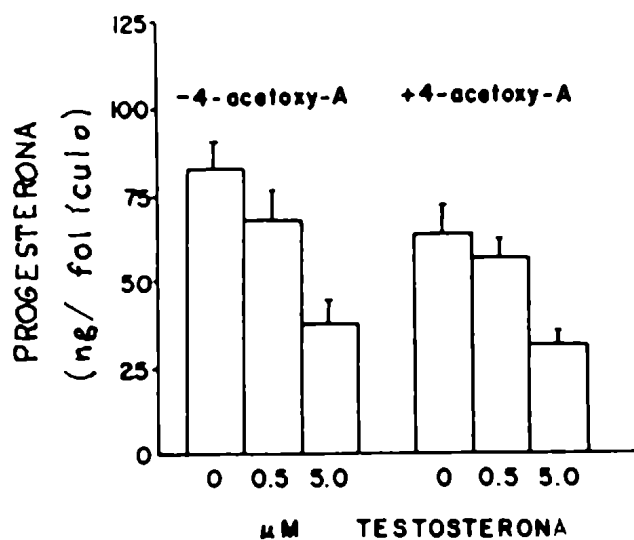


Figura 24: Efecto de un inhibidor de la aromatasa sobre la acumulación de progesterona por células granulosas en cultivo. El medio contenía un folículo equivalente de células, 1 ug/ml de FSH, 0 o 1 ug/ml de 4-acetoxi-androstenediona, y las concentraciones indicadas de testosterona. (n=9).

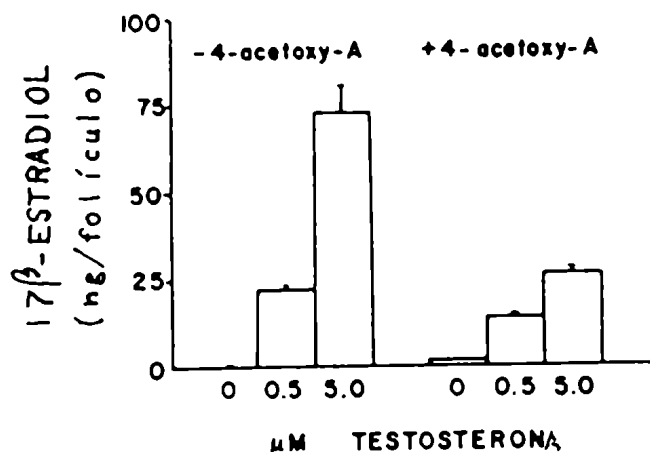


Figura 25: Efecto de un inhibidor de la aromatasa sobre la acumulación de 17β-estradiol por células granulosas en cultivo. El medio contenía un folículo equivalente de células, 1 ug/ml de FSH, 0 o 1 ug/ml de 4-acetoxi-androstenediona, y las concentraciones indicadas de testosterona. (n = 9).

($P < 0,001$); no había interacción. Sin embargo, en presencia de 4 a A, testosterona seguía inhibiendo la síntesis de progesterona. Por lo tanto, 4 a A no pudo impedir la inhibición de la síntesis de progesterona dependiente de testosterona.

3.4.3 Efecto de Testosterona sobre la Síntesis de Progesterona Estimulada por Dibutiril-AMP cíclico.

Los andrógenos podrían inhibir la producción de progesterona en respuesta a FSH interfiriendo con la unión de FSH a su receptor, interfiriendo con el acoplamiento del receptor a la adenilato ciclase en la producción de AMP cíclico, estimulando la fosfodiesterasa y/o inhibiendo las enzimas involucradas en la biosíntesis de progesterona. Para determinar si los andrógenos actuaban antes o después de la producción de AMP cíclico, células granulosas fueron cultivadas por 24 horas en medio conteniendo dibutiril AMP cíclico (1mM) solo, testosterona (5 μ M) sola, o testosterona y dibutiril AMP cíclico, en un experimento factorial 2x2. Como se observa en la Figura 26, dibutiril AMP cíclico estimuló significativamente ($P < 0,001$) la síntesis de progesterona tanto en ausencia como en presencia

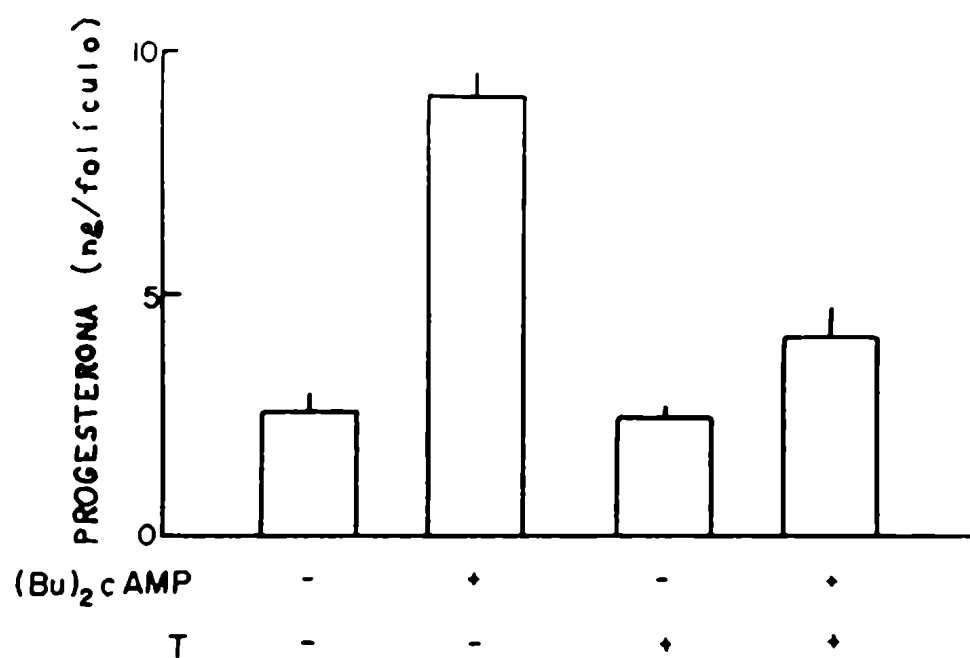


Figura 26: Efecto de cultivar células granulosas porcinas por 24 hs en medio solo (control), con testosterona (5 μM) y/o $(Bu)_2cAMP$ (1 mM) sobre la acumulación de progesterona (promedio \pm E.S.; n = 12).

de testosterona, y testosterona ejerció una inhibición significativa ($P < 0,002$) sobre la síntesis de progesterona. Una interacción altamente significativa ($P < 0,01$) indicó que el efecto de testosterona sobre la acumulación de progesterona era diferente dependiendo de la presencia o ausencia de dibutiril AMP cíclico.

Células granulosas fueron cultivadas por 24 horas en presencia de distintas cantidades de dibutiril AMP cíclico y testosterona. La acumulación de progesterona en el medio de cultivo está representada en la Figura 27. En ausencia de testosterona, dibutiril AMP cíclico estimuló la producción de testosterona ($P < 0,001$) de manera dosis-dependiente; una dosis de 0,5 mM de dibutiril AMP cíclico fue suficiente para causar una estimulación significativa ($P < 0,05$). La presencia de testosterona inhibió significativamente ($P < 0,01$) la síntesis de progesterona estimulada por dibutiril AMP cíclico, pero no afectó la síntesis basal de progesterona ($P > 0,1$). En presencia de testosterona 0,5 μ M, la menor concentración de dibutiril AMP cíclico necesaria para producir un aumento significativo en la síntesis de progesterona fue de 1 mM, mientras que, en presencia de testosterona 5 μ M, se requirieron 2 mM de dibutil AMP cíclico. La acumulación de progesterona en presencia

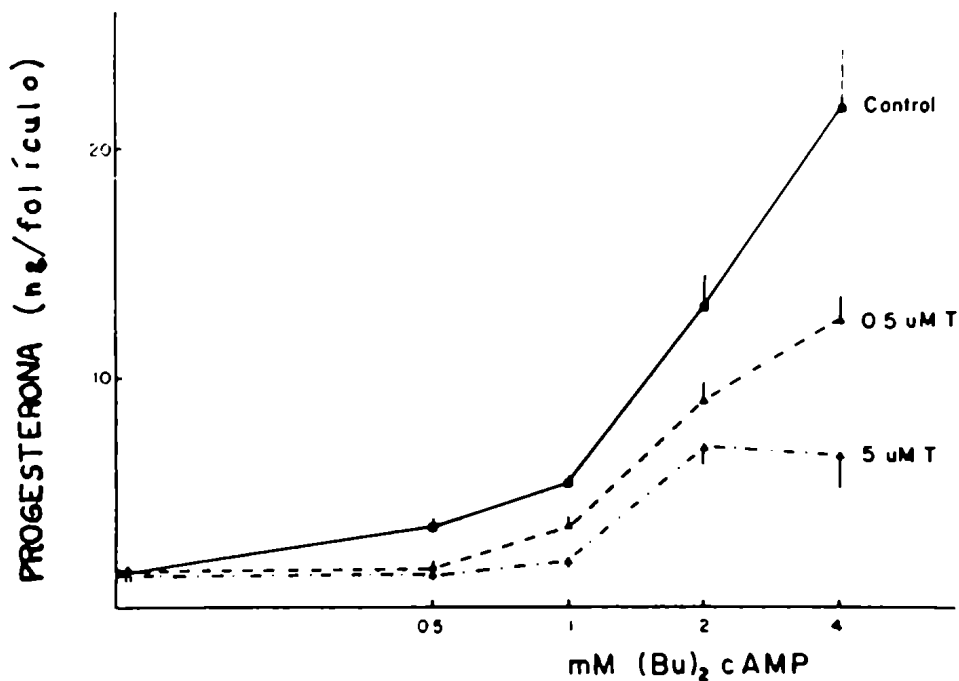


Figura 27: Relación dosis-respuesta en la estimulación de la acumulación de progesterona por dibutiril AMP cíclico en presencia o ausencia de testosterona. Los puntos representan el promedio \pm E.S. de 4 cultivos replicados.

de 1 μ g/ml FSH fue de $18,5 \pm 4,7$ ng/cultivo, y fue disminuída a $4,7 \pm 0,9$ ng/cultivo en presencia de testosterona 5 μ M. Estos resultados sugieren que la inhibición es ejercida a un paso posterior a la formación de AMP cíclico.

3.4.4 Efecto de los Andrógenos sobre la Síntesis de Pregnenolona por Células Granulosas.

Con el objeto de determinar la capacidad de las células granulosas de sintetizar pregnenolona en cultivo, células granulosas fueron cultivadas por distintos tiempos en presencia o ausencia de FSH. Finalizado el período de cultivo, pregnenolona fue determinada por radioinmunoensayo de alícuotas del medio de cultivo y de los extractos etanólicos del tejido. La cantidad de pregnenolona acumulada en el medio así como el contenido total de pregnenolona en medio y células al final de los distintos períodos de incubación están representados en la Figura 28. Los cultivos control sintetizaron pregnenolona a lo largo de las 48 horas de cultivo, aunque la síntesis fue menor luego de las primeras 24 horas. FSH estimuló significativamente ($P < 0,001$) tanto la acumulación en el medio de cultivo co-

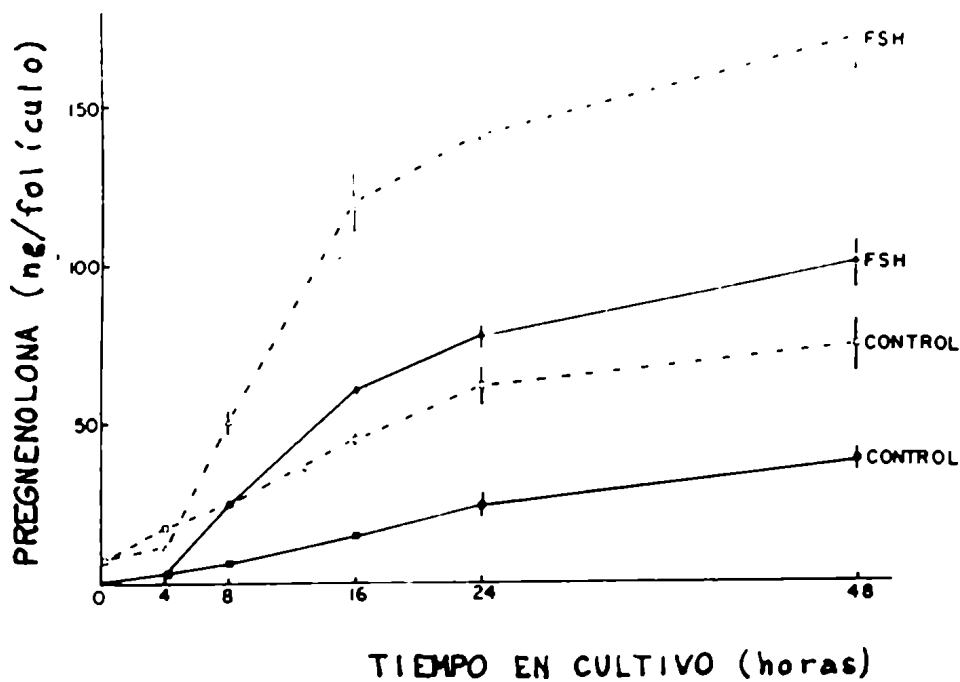


Figura 28: Curva de tiempo para la síntesis de pregnenolona (medida en tejido y medio) en presencia (Δ) y ausencia (\square) de FSH, y de la acumulación de pregnenolona en el medio para cultivos control (\blacksquare) y tratados con FSH (\blacktriangle). Cada punto representa el promedio \pm E.S. de 4 incubaciones.

mo la cantidad total de esteroide sintetizado. Esta estimulación fue evidente a partir de las primeras 4 horas de cultivo.

Como se observa en la Figura 28, la cantidad de pregnenolona presente en el tejido fue alta tanto a tiempo cero como al final de los distintos períodos de incubación. Sin embargo, el perfil de acumulación en medio de cultivo no difirió del de síntesis total (cantidad de esteroide presente en medio y tejido al final del período de cultivo menos el contenido tisular inicial). Más aún, la cantidad total de pregnenolona sintetizada estaba altamente correlacionada con la cantidad presente en el medio en los cultivos control ($r = 0,970$) y en los tratados con FSH ($r = 0,991$). Dado que en presencia de testosterona 5 μM (datos no mostrados), la cantidad de esteroide acumulada en el medio también estaba altamente correlacionada con la cantidad total sintetizada ($r = 0,986$), en experimentos subsiguientes sólo se determinó la acumulación en el medio de cultivo.

Para determinar el efecto de los andrógenos aromatizables sobre la síntesis de pregnenolona, células granulosas fueron cultivadas por 24 horas en presencia de Δ^4 -androstenediona o testosterona a concentraciones de 0,5 μM y 5 μM ,

con o sin FSH. Como se observa en la Figura 29, adición de Δ^4 -androstenediona a células granulosas estimuló significativamente la síntesis basal de pregnenolona ($P < 0,001$). En presencia de FSH, Δ^4 -androstenediona estimuló la síntesis de pregnenolona de una manera dosis-dependiente ($P < 0,05$).

El efecto de concentraciones bajas ($5 \times 10^{-7}M$) y altas ($5 \times 10^{-6}M$) de testosterona sobre la producción de pregnenolona por células granulosas en cultivo está representado en la Figura 30. La concentración alta causó un incremento del 40 % en la acumulación basal de pregnenolona ($P < 0,01$) y del 60 % en la acumulación de pregnenolona estimulada por FSH ($P < 0,05$).

Para determinar si los andrógenos estimulaban la síntesis de pregnenolona actuando antes o después de la formación de AMP cíclico, células granulosas fueron cultivadas por 24 horas en medio conteniendo dibutiril AMP cíclico (1 mM) solo, testosterona (5 μM) sola o testosterona y dibutiril AMP cíclico en un experimento factorial 2 x 2. Como se observa en la Figura 31, dibutiril AMP cíclico estimuló significativamente ($P < 0,001$) la acumulación de pregnenolona en presencia o ausencia de testosterona. Testosterona aumentó significativamente ($P < 0,001$) la síntesis de pregnenolona. La ausencia de una interacción

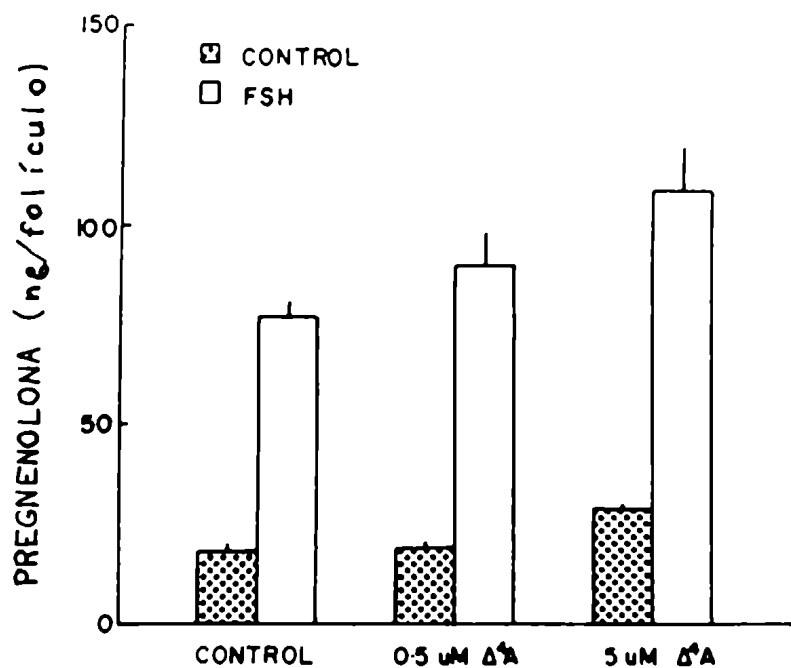


Figura 29: Efecto de Δ^4 -androstenediona (Δ^4A) y FSH sobre la producción de pregnenolona durante un período de cultivo de 24 hs. Los valores representan el promedio \pm E.S. de 8 cultivos.

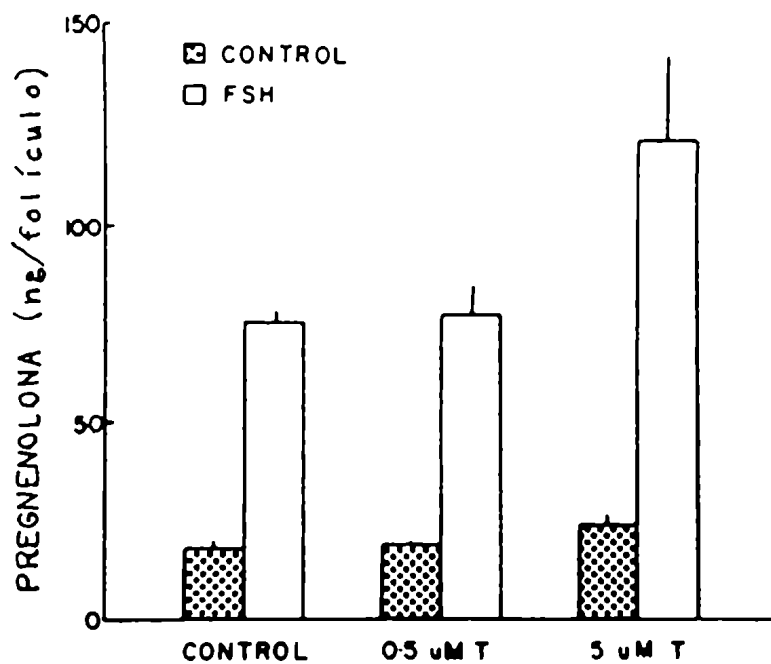


Figura 30: Efecto de testosterona (T) y FSH sobre la acumulación de pregnenolona en 24 hs. Los valores representan el promedio \pm E.S. de 8 cultivos.

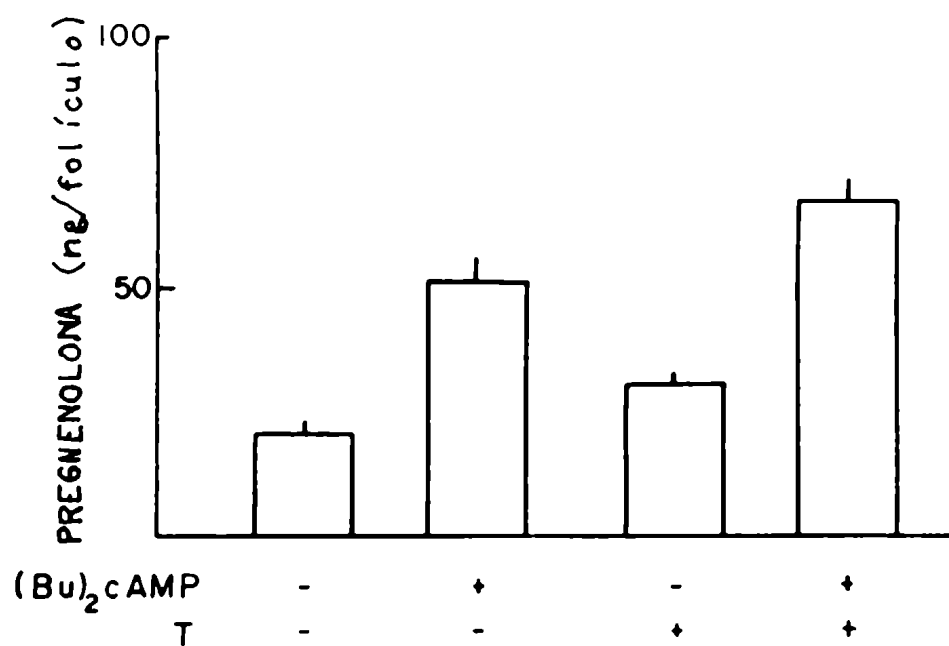


Figura 31: Efecto de testosterona (T, 5×10^{-6} M) y dibutil AMP cíclico (1 mM) sobre la producción de pregnenolona en 24 hs. Los valores representan el promedio \pm E.S. de 12 cultivos.

significativa indicó que este efecto era independiente de la presencia de dibutiril AMP cíclico.

Células granulosas fueron cultivadas por 24 horas en presencia de distintas cantidades de dibutiril AMP cíclico. La acumulación de pregnenolona en el medio de cultivo está representada en la Figura 32. Dibutiril AMP cíclico estimuló significativamente ($P < 0,001$) la síntesis de pregnenolona desde la menor concentración ensayada (0,5 mM). Testosterona causó un incremento significativo ($P < 0,001$) en la síntesis de pregnenolona en respuesta a las distintas concentraciones de dibutiril AMP cíclico. La mayor dosis fue efectiva a todos los niveles de dibutiril AMP cíclico mientras que la menor sólo produjo un aumento significativo ($P < 0,05$) a una concentración de dibutiril AMP cíclico de 1 mM. Estos resultados demuestran que los andrógenos aromatizables aumentan la acumulación de pregnenolona en cultivos control así como en presencia de FSH o de dibutiril AMP cíclico. Dado que anteriormente se observó que los andrógenos aromatizables inhibían la síntesis de progesterona dependiente de FSH en los mismos cultivos, la observación de un efecto estimulador sobre la síntesis de pregnenolona sugiere que estos andrógenos actúan sobre la conversión de pregnenolona a progesterona dependiente de FSH.

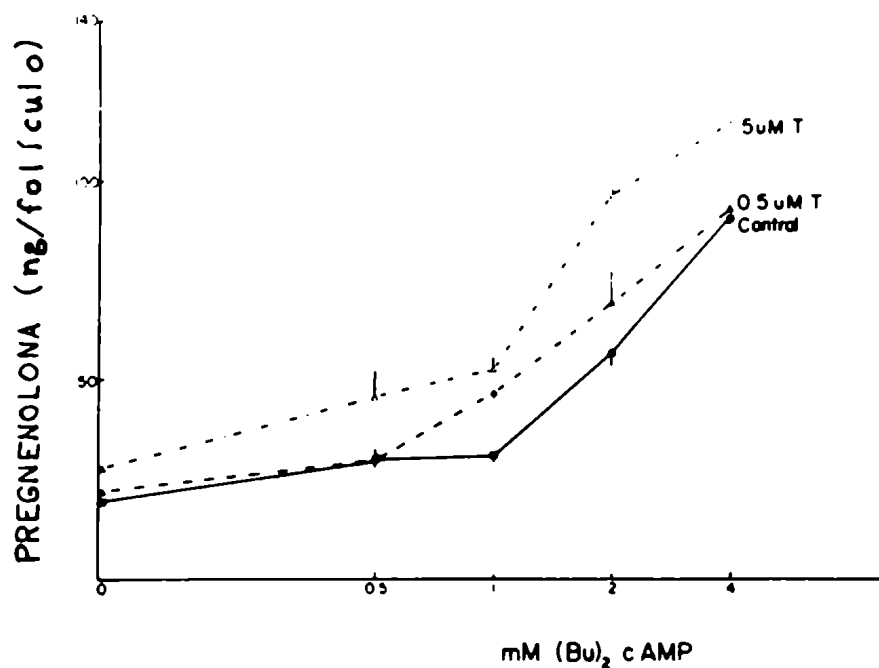


Figura 32: Relación dosis-respuesta en la estimulación de la acumulación de pregnenolona por dibutiril AMP cíclico en presencia o ausencia de testosterona. Los puntos representan el promedio \pm E.S. de 4 cultivos replicados.

4.0 DISCUSION

4.1 Rol de las Células Granulosas en la Síntesis de Andrógenos.

La mayor parte de la evidencia acumulada en base a estudios "in vitro" con tipos celulares ováricos aislados sugiere que, al menos en los estadios más tempranos del desarrollo folicular preovulatorio, las células tecales y granulosas actúan sinérgicamente en la biosíntesis de estrógenos. La naturaleza de este sinergismo parece ser el de un pasaje de sustratos : las células tecales producen andrógenos que son luego transportados a las células granulosas, donde son aromatizados a estrógenos (38).

Está bien establecido que las células tecales son responsables de la síntesis folicular de andrógenos y que LH es la gonadotropina responsable de su control (109-114). Los resultados de la primer parte de esta investigación indican que, en ausencia de LH, las células granulosas proveerían el sustrato (pregnenolona), para la síntesis tecal de andrógenos; esto proporciona evidencia de interacción entre ambos tipos celulares

en la síntesis basal de andrógenos.

Medio en que células granulosas habían sido cultivadas previamente en presencia de FSH estimuló la síntesis tecal basal de andrógenos (Δ^4 -androstenediona y testosterona).

Estudios en diversas especies han indicado la presencia en el fluido folicular de factores no esteroideos (probablemente péptidos) que regularían la maduración del ovocito, la luteinización de las células granulosas y la unión de FSH a células granulosas, así como la secreción pituitaria de FSH (reseñado recientemente, 115). Dado que las células granulosas parecen ser las células foliculares responsables de la síntesis de por lo menos dos de estos factores (116, 117), pareció razonable suponer que el efecto de las células granulosas sobre la síntesis tecal de andrógenos es ejercido mediante la producción de un factor similar.

Al ser extraído con carbón-dextrán, el medio usado por células granulosas perdió su capacidad de estimular la síntesis de andrógenos, indicando que alguna pequeña molécula presente en dicho medio sería la responsable de esta estimulación. El hecho de que cultivos tratados con 50 % de medio usado extraído con carbón-dextrán produjeran cantidades significativas de andrógenos (similares a los cultivos control) indi

có que la ausencia de efecto del medio extraído no se debía a cantidades limitantes de algún factor necesario para la supervivencia de las células tecales en cultivo. Aunque la extracción con carbón-dextrán podría eliminar otras moléculas pequeñas, se examinó la posibilidad de que las células granulosas actuaran proveyendo un precursor esteroideo.

Se sabe que las células granulosas porcinas producen grandes cantidades de progesterona, siendo esta síntesis estimulada por FSH (y LH) (27). La síntesis de pregnenolona por cultivos de células granulosas porcinas no ha sido determinada anteriormente. Los resultados de este estudio indican que la síntesis de pregnenolona inmunoreactiva es incluso más elevada que la de progesterona. También se observó que el fluido folicular porcino contiene niveles más elevados de pregnenolona que de progesterona (datos no publicados). Aunque la identidad del material semejante a pregnenolona no fue confirmada químicamente, la relación observada entre los niveles de pregnenolona inmunoreactiva medida en estos experimentos en el medio usado por células granulosas, y la capacidad del medio de estimular la síntesis tecal de andrógenos, respalda nuestra interpretación de su identidad.

Si bien progesterona exógena fue capaz de incremen-

tar la síntesis tecal de andrógenos, los niveles de este esteroide presentes en el medio usado por cultivos de células granulosas parecieron ser bajos para causar el aumento observado. Los niveles de pregnenolona presentes en Mg (medio usado por células granulosas cultivadas en presencia de FSH) podrían causar este aumento. Sin embargo, las cantidades relativas de ambos andrógenos fueron distintas; medio usado por cultivos de células granulosas estimuló la síntesis de testosterona al doble y la de Δ^4 -androstenediona al triple, en tanto que una cantidad equivalente de pregnenolona exógena causó un aumento de 2 veces en la producción de Δ^4 -androstenediona y un aumento menor en la de testosterona.

Estos resultados, que demuestran utilización de pregnenolona exógena para la síntesis de andrógenos, están de acuerdo con informes previos sobre estudios "in vivo" e "in vitro". Young Lai y Short (118) inyectaron pregnenolona radioactiva dentro de un folículo ovárico de una yegua y encontraron incorporación de la radioactividad en Δ^4 -androstenediona en sangre de vena ovárica. Lacroix y col. (119) observaron conversión de pregnenolona radioactiva a Δ^4 -androstenediona por preparaciones tecales bovinas en cultivo. Fortune (120) demostró interacciones entre células tecales y granulosas bovinas

en la síntesis de C_{19} -y C_{21} -esteroides, en presencia de LH. Nuestras observaciones indican que, en el ovario porcino, las células granulosas podrían proveer el sustrato C_{21} -esteroideo en ausencia de estimulación por LH. De este modo las células granulosas podrían controlar la síntesis tecal de andrógenos cuando LH no está disponible. Ya que las células granulosas derivadas de folículos medianos de cerdo son capaces de aromatizar andrógenos a estrógenos (29, 31), el hecho de que estimulen la síntesis tecal de andrógenos plantea la interesante posibilidad de un rol para las células granulosas en controlar la síntesis del sustrato que usan para la aromatización.

4.2 Capacidades Relativas de los Tipos Celulares Foliculares Aislados y en Recombinación para Sintetizar Andrógenos y Estrógenos.

Las preparaciones tecales produjeron grandes cantidades de andrógenos, predominantemente androstenediona. Las preparaciones de pared folicular (folículo en que se hizo una incisión para eliminar el fluido folicular, dejando intactas la capa tecal y la membrana granulosa) produjeron cantidades más

elevadas de testosterona que las células tecales (observaciones no publicadas). Esto está de acuerdo con evidencia en cerdo (25), hamster (121) y oveja (37) de que las células granulosas poseen una actividad de 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa más elevada que las tecales. Las preparaciones tecales produjeron cantidades pequeñas de estrógenos; adición de células granulosas causó un incremento al triple en la producción de estrógenos. Estos resultados son similares a aquellos obtenidos por Evans y col. (29) en la cerda prepúber. Aunque estos autores no han incubado células tecales y granulosas en co-cultivo, sus resultados para la producción de estrógenos por células granulosas aisladas, en presencia de testosterona exógena, indican que en su sistema también ocurriría sinergismo.

Recientemente, Haney y Schomberg (35) informaron que en folículos porcinos de 4-5 mm la teca es responsable de la mayor parte de la producción total de estrógenos, no observando un aumento significativo en su síntesis al agregar células granulosas a los cultivos. Podría ser que folículos derivados de animales sexualmente maduros se comportaran de distinta manera, aunque también es posible que las diferencias en resultados se deban a técnicas de separación de tipos celulares o a medios de cultivo empleados. Sin embargo, aunque dichos

autores no observaron un aumento en la síntesis de estradiol al co-cultivar ambos tipos celulares, sus resultados demuestran mayor conversión de andrógenos exógenos por células granulosa que por preparaciones tecales.

En conclusión, los resultados obtenidos del cultivo de tipos celulares foliculares respaldan la teoría bicelular bigona dotrófica para la biosíntesis de estradiol en folículos porcinos de tamaño mediano. En las condiciones usadas, fuimos incapaces de observar un efecto estimulador de FSH sobre la aromatización de andrógenos a estrógenos, confirmando los resultados obtenidos por Evans y col. (29). Sin embargo, no se ha examinado la posibilidad de que FSH pueda inducir actividad de aromatasa en folículos menos maduros.

Además, los resultados obtenidos del co-cultivo de tipos celulares foliculares en este estudio sugieren un rol para las células granulosa en el metabolismo de andrógenos. Al co-cultivar células tecales y granulosa se observó una disminución drástica en la acumulación de andrógenos (Δ^4 -androstenediona más testosterona), que no estaba correlacionada con un aumento en la síntesis de 17β -estradiol. Ya que las células granulosa son capaces de aumentar la síntesis tecal de andrógenos proveyendo sustrato esteroideo, un efecto inhibitorio de las célu-

las granulosa sobre la síntesis de andrógenos pareció improbable. En cambio, se examinó la capacidad de las células granulosa porcina de metabolizar andrógenos.

4.3 Síntesis de Sulfatos de Andrógenos.

Los resultados de la presente investigación proporcionan evidencia para la síntesis de sulfatos de andrógenos por células granulosa porcina. Existen varios factores que respaldan esta evidencia.

- (1) Al cultivar células granulosa en presencia de Δ^4 -androstenediona o testosterona, se obtienen derivados de estos esteroides, solubles en agua.
- (2) Luego de precipitar las proteínas, este compuesto se comporta en columnas de DEAE-Sephadex A 25 como un monosulfato de esteroide neutro (Figuras 9 y 10; 122). Los sulfatos de estrógenos son retenidos más tiempo en estas columnas (123, 124).
- (3) Luego de solvólisis se obtiene un compuesto soluble en éter. Esto respalda la evidencia de la presencia de un sulfato de

C₁₉-esteroide, debido a que los glucurónidos de esteroides no son hidrolizados bajo las condiciones usadas (101).

La formación de sulfatos de C₁₉-esteroides en el ovario ha sido descrita anteriormente. Se observó formación de sulfato de dehidroepiandrosterona por homogenatos de ovarios humanos (76, 80). Sturm y Hannapel (82) observaron formación de sulfato de testosterona por homogenatos de folículos y cuerpos lúteos de rata y bovinos. Experimentos con ovarios humanos de la fase folicular, perfundidos, (85) mostraron conversión de sólo 1 % del sustrato radioactivo a sulfatos esteroideos, siendo un tercio de estos, sulfatos de estrógenos. En este estudio se observó una mayor conversión (alrededor del 40 %) a monosulfatos de andrógenos. La baja conversión observada por Sturm y col. (85) podría deberse a la presencia de grandes cantidades, no fisiológicas, de sustrato, aunque también es probable que se deban a diferencias entre especies. Más aún, nuestras observaciones sugieren que las células granulosas son el lugar en que ocurre la formación folicular de sulfatos de andrógenos.

Se ha especulado que, en los tejidos endócrinos, los sulfatos de esteroides desempeñan una variedad de funciones, como productos de desactivación, como precursores de hormonas activas, así como estando involucrados en los mecanismos

regulatorios dentro de estos tejidos manteniendo niveles de esteroides libres por interacción con la enzima limitante, la sulfatasa (74, 75). Se podría especular que, en el ovario, la formación de sulfatos podría controlar la cantidad intrafolicular de andrógeno libre, evitando la atresia del folículo. Estos andrógenos podrían tal vez ser usados, posteriormente, para la síntesis de estrógenos, ya que aparentemente no son esteroides 5α - o 5β - reducidos. Esto no requeriría acción previa de la sulfatasa ya que existe evidencia de aromatización directa de sulfatos de esteroides neutros (87).

El hecho de que 20 % de la radioactividad inicial soluble en agua se comportara consistentemente como esteroides libres en columnas de DEAE-Sephadex, luego de precipitar las proteínas (Figura 9), sugiere que estos estaban inicialmente unidos a proteínas. En efecto, en fluido folicular de diversas especies, se han encontrado proteínas que unen esteroides (124). Estas proteínas podrían originarse en células granulosas, ya que estas células son activas en la biosíntesis de proteínas (3, 4).

Separación cromatográfica del producto solvolizado de los distintos lotes de células granulosas confirmó que los esteroides conjugados no son ninguno de los productos conoci-

dos del metabolismo de andrógenos en el ovario. Si bien el metabolito muy polar (aislado en las columnas de fase reversa) apareció en todas las incubaciones, la presencia del metabolito menos polar (aislado en las columnas de fase normal) no fue consistente. Podría ser que este último no fuera estable bajo las condiciones de hidrólisis usadas. Los procedimientos solvolíticos pueden ser químicos o enzimáticos. Los procedimientos químicos (altas temperaturas, condiciones ácidas) podrían alterar la estructura del esteroide, introduciendo artificios (125). Aunque los procedimientos enzimáticos no presentan este problema, a nuestro conocimiento, no existen preparaciones de sulfatasa pura disponibles. Alternativamente, podría ser que las células granulosas metabolizaran el andrógeno a varios productos, variando las cantidades relativas de cada uno de estos con el medio ambiente hormonal al que hubieran sido expuestas en el folículo. Aunque en todos los experimentos se usaron folículos de aproximadamente el mismo tamaño, podría ser que estos hubieran sido expuestos a distintas concentraciones de gonadotrofinas "in vivo".

Los resultados inconsistentes obtenidos en los ensayos enzimáticos de sulfotransferasa también podrían deberse a una capacidad diferencial de las células de usar los distintos sus-

tratos. Las sulfotransferasas son enzimas muy específicas (126) y es posible que ninguno de los esteroides empleados como sustratos sea el sustrato específico para la enzima presente en células granulosas porcinas. Además, no pudo realizarse un estudio completo (usando distintos sustratos) de la actividad de la enzima debido a que la cantidad de material obtenido en cada experimento no fue suficiente para llevar a cabo más que dos ensayos enzimáticos. Sin embargo, cuando (^{35}S)- Na_2SO_4 fue incluido en la mezcla de reacción, se pudo obtener 2 veces (usando el mismo lote) incorporación en el conjugado, con (^3H) -androsterona como sustrato, obteniendo evidencia independiente de la capacidad de las células granulosas de conju-
gar andrógenos a iones sulfato.

4.4 Efecto de la Teca sobre la Síntesis de Progesterona por las Células Granulosas.

La hormona folículo-estimulante (FSH) se une a receptores específicos en células granulosas derivadas de folículos porcinos de tamaño mediano (17) estimulando la producción de AMP cíclico (127) y la síntesis de progesterona (27). Los resul

tados de este estudio demuestran que los andrógenos aromatizables, androstenediona y testosterona, inhiben esta acumulación de progesterona en respuesta a FSH.

En ratas, se ha establecido que tanto los andrógenos aromatizables como los no aromatizables aumentan la síntesis de progesterona por células granulosas aisladas, estimuladas por FSH (128-130). La potencia de testosterona y DHT ha sido relacionada con su velocidad de metabolismo dentro de las células, y la potencia de otros andrógenos con su grado de conversión a testosterona y DHT (131). Por otra parte, se ha implicado a los andrógenos en la inhibición del desarrollo ovárico en ratas inmaduras hipofisectomizadas tratadas con dietilestilbestrol (132). De acuerdo con esto se ha dicho que, en ratas, los andrógenos estimulan la síntesis de progesterona y son "atretogénicos" (133).

En cultivos de células granulosas humanas, testosterona inhibió la biosíntesis de progesterona cuando las células provenían de folículos grandes (133) pero no de folículos pequeños (134).

En cerdos, Thanki y Channing (47) observaron que testosterona inhibía la producción de progesterona estimulada por FSH, mientras que Schomberg y col. (44, 45) informaron que

los andrógenos estimulaban la síntesis basal de progesterona en 48 horas de cultivo, siendo esta estimulación significativa en el caso de DHT pero no en el de testosterona. La discrepancia aparente entre los resultados de Schomberg y los obtenidos en este estudio se pueden atribuir a varios factores. La inhibición de la síntesis de progesterona observada en este estudio sólo fue evidente cuando FSH estaba presente durante el cultivo; no se observó efecto alguno de los andrógenos (Δ^4 -androstenediona, testosterona, androsterona y DHT) sobre la síntesis basal de progesterona en 24 horas de cultivo. Nos pareció adecuado incluir FSH en los cultivos ya que las células granulosas están expuestas a FSH "in vivo". Cultivando células granulosas en presencia de FSH, Anderson y col. (31) observaron que testosterona no ejercía un efecto significativo sobre la síntesis de progesterona después de 2 días en cultivo, aunque, en cultivos de 4 días testosterona actuaba sinérgicamente con FSH en la estimulación de la síntesis de progesterona. Dado que luego de 2 días en cultivo, las células granulosas porcinas presentan características morfológicas de células luteinizadas (27), parecería que testosterona es capaz de estimular la síntesis de progesterona por células luteinizadas. En este estudio no se prolongaron los cultivos por más de 24 horas pa-

ra poder obtener una aproximación de lo que ocurre cuando las células forman parte del folículo.

Las diferencias observadas también podrían deberse a los medios de cultivo y al tipo de animales usados como fuente de células granulosas. En este estudio se usaron células provenientes de folículos ováricos de cerdas prepúberes, que son relativamente inmaduras aunque capaces de desarrollar respuestas esteroideogénicas normales (29). Los otros autores (31, 44, 45) también usaron folículos relativamente inmaduros, aunque aislados de ovarios de cerdas sexualmente maduras. Usando células granulosas obtenidas de cerdas maduras observamos que la estimulación de la síntesis de progesterona por FSH era similar a la obtenida con folículos comparables de cerdas prepúberes, y que testosterona inhibía esta respuesta en forma análoga (Tabla VIII). Por lo tanto, las diferencias en resultados no pueden ser explicadas por diferencias en la fuente de células granulosas.

Es improbable que la inhibición observada en el presente estudio se deba a un efecto tóxico de los andrógenos sobre las células granulosas ya que células cultivadas por 24 horas en presencia de testosterona y FSH fueron capaces de producir niveles elevados de progesterona durante un período subsi-

guiente de 24 horas en ausencia de hormona exógena (Tabla IX).

Los datos presentados sugieren que la acumulación disminuída de progesterona en presencia de testosterona se debe a inhibición de la síntesis de progesterona y no a estimulación de su metabolismo. Los andrógenos podrían inhibir la síntesis de progesterona interfiriendo con la unión de FSH a su receptor, interfiriendo con el acoplamiento del receptor a la adenilato ciclasa, estimulando la fosfodiesterasa y/o inhibiendo las enzimas involucradas en la biosíntesis de progesterona. Para determinar si la inhibición ocurría a un paso anterior o posterior a la formación de AMP cíclico, células granulosas fueron incubadas con dibutilil AMP cíclico en presencia o ausencia de distintas concentraciones de testosterona. Se observó que testosterona también inhibía la acumulación de progesterona en respuesta a dibutilil AMP cíclico. Más aún, la extensión de la inhibición fue la misma: una disminución de 70 % en la síntesis de progesterona en respuesta a dibutilil AMP cíclico (4 mM) y de 75 % en la síntesis en respuesta a FSH (1 ug/ml).

Esto sugirió que los andrógenos actuaban a una etapa posterior a la formación de AMP cíclico. Por lo tanto, los andrógenos inhibirían alguna enzima en el camino biosintético y/o estimularían la actividad de fosfodiesterasa.

TABLA IX

Acumulación de progesterona (ng/folículo equivalente) por células granulosas mantenidas en cultivo por 48 hs (n = 8). Las células fueron cultivadas por 24 hs en presencia o ausencia de FSH (1 ug/ml) y testosterona (5 uM); a las 24 hs el medio fue reemplazado totalmente por medio fresco sin hormonas exógenas.

Hormonas Presentes Durante <u>las Primeras 24 hs de Cultivo</u>	<u>0-24 hs</u>	<u>24-48 hs</u>
--	2,5 ± 0,2	1,6 ± 0,1
FSH + T	6,3 ± 0,5	2,9 ± 0,3

Estudios preliminares con un inhibidor de fosfodiesterasa (3-isobutil-metil-xantina, IBMX) demostraron que, aunque IBMX (0,1 mM) aumentaba la síntesis basal de progesterona por células granulosas en cultivo, adición de IBMX a células cultivadas en presencia de FSH o dibutiril AMP cíclico resultaba en una acumulación disminuída de progesterona, aunque la acumulación de pregnenolona en los mismos cultivos no era afectada.

Esto está de acuerdo con observaciones de que niveles altos de AMP cíclico inhiben notablemente a la 3β -hidroxisteroide deshidrogenasa- Δ^5 isomerasa en tejido adrenal (135) y ovárico (136) de rata.

Células granulosas produjeron cantidades elevadas de pregnenolona, siendo esa síntesis estimulada por FSH (de 2 a 3 veces). Los andrógenos (Δ^4 A o T) aumentaron aún más la síntesis de pregnenolona en respuesta a FSH. Dibutiril AMP cíclico estimuló la síntesis de pregnenolona de una manera dosis dependiente, siendo esta síntesis también aumentada por testosterona. Ya que bajo las mismas condiciones los andrógenos inhibían la síntesis de progesterona, se concluyó que los andrógenos aromatizables afectan la conversión de pregnenolona a progesterona.

La conversión de pregnenolona a progesterona es catalizada por un sistema de $\Delta^5-3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa / Δ^5-3 -cetoesteroide isomerasa, que es activo en células granulosas porcinas (25). Recientemente, Dorrington y Armstrong (137) informaron que FSH estimula marcadamente la actividad de este sistema enzimático en células granulosas de rata. Evidencia indirecta confirma que también en células granulosas de cerdo FSH actúa a este nivel, ya que FSH produjo un porcentaje más alto de estimulación de síntesis de progesterona que de pregnenolona, aunque la cantidad absoluta de pregnenolona producida por encima de los valores control fue mayor. Por lo tanto, parece que la síntesis disminuída de progesterona en respuesta a FSH en presencia de andrógenos se debe a una inhibición de la $\Delta^5-3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa isomerasa. La inhibición de esta enzima por esteroides ha sido informada anteriormente. En la placenta humana, Wiener y Allen (138) observaron inhibición de la $\Delta^5-3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa por 20α -hidroxi-4-pregnen-3-ona, mientras que Townsley (139) observó que los Δ^4-3 -cetoesteroides eran potentes inhibidores de la enzima. La inhibición por Δ^4 -andros_{tenediona} y testosterona era de tipo no competitivo, y sólo podía ser interrumpida por metabolismo del inhibidor y/o su eli-

minación de los alrededores de la enzima. Aunque no se han realizado ensayos enzimáticos, la observación de una disminución en la acumulación de progesterona y un aumento en la de pregnenolona sugieren que los Δ^4 -3-cetoesteroides inhiben a la Δ^5 -3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa - Δ^5 -isomerasa en células granulosas de folículo ovárico porcino como en la placenta.

Las concentraciones de Δ^4 -androstenediona o de testosterona necesarias para producir inhibición de la síntesis de progesterona o aumento de la acumulación de pregnenolona parecerían ser elevadas. Los niveles de andrógenos en el fluido folicular parecen ser menores (36, 140, Lischinsky y Armstrong, datos no publicados). Sin embargo, las preparaciones tecales porcinas sintetizan grandes cantidades de andrógenos. Por lo tanto, las concentraciones de Δ^4 -androstenediona y testosterona en los alrededores de las células granulosas adyacentes a la capa tecal podrían ser mucho más elevadas. Además, dado que los efectos inhibitorios de estos esteroides parecen ser acumulativos (139), la extensión de la inhibición reflejaría la concentración total local de inhibidores.

Nuestros resultados indican que los andrógenos afectan principalmente la actividad de la enzima estimulada por

FSH, ejerciendo un efecto menor sobre su actividad basal. Dado que el aumento en la acumulación de pregnenolona excedió en masa a la disminución en los niveles de progesterona, podría ser que los andrógenos también inhiban el metabolismo de pregnenolona a lo largo de otros caminos. Alternativamente, los andrógenos podrían estimular la síntesis de esteroides de 21 átomos de carbono en un paso anterior a la formación de pregnenolona.

No se sabe si los andrógenos producen esta inhibición por sí mismos o luego de ser metabolizados a otro producto. Ya que sólo los andrógenos aromatizables testosterona y Δ^4 -androstenediona, pero no DHT y androsterona, fueron capaces de provocar esta inhibición, fue necesario determinar si la reducción en la acumulación de progesterona se debía a la conversión de los andrógenos a estrógenos. 17β -Estradiol inhibió la acumulación de progesterona en este sistema, de acuerdo con resultados obtenidos por otros investigadores en células granulosas porcinas (45, 47) y bovinas (141). Sin embargo, nuestros resultados indican que testosterona inhibe la producción de progesterona en respuesta a FSH sin previa aromatización a 17β -estradiol. La inclusión de testosterona en el medio de cultivo inhibió notablemente la acumulación de progesterona en 8 horas de

cultivo, mientras que los niveles de estradiol no aumentaron sustancialmente hasta después de 8 horas. Aunque el contenido de esteroides en el medio no es necesariamente un fiel reflejo de los niveles intracelulares, e incluso niveles relativamente bajos de 17β -estradiol podrían causar efectos fisiológicos, parecería que testosterona ejerce un efecto inhibitorio sobre la producción de progesterona en ausencia de un aumento importante en la síntesis de estradiol. Si bien esta evidencia no es concluyente, también se demostró que una reducción sustancial en los niveles de estradiol provocada por la presencia de un inhibidor de la aromatasa era incapaz de prevenir la inhibición de la acumulación de progesterona por testosterona. En realidad, el inhibidor de la aromatasa por sí mismo causó una disminución en la síntesis de progesterona; el mecanismo de esta acción es desconocido, pero 4-acetoxi-androstenediona es un andrógeno y podría ejercer efectos inhibitorios semejantes a testosterona y Δ^4 -androstenediona.

El hecho de que ni DHT ni androsterona inhiban la síntesis de progesterona también indica que la reducción en la posición 5 no es probablemente un paso obligatorio en la acción de testosterona y Δ^4 -androstenediona.

Las células granulosas de rata contienen receptores

a andrógenos que pueden unir tanto DHT como testosterona (142). Por lo tanto, testosterona podría actuar luego de unirse a su receptor, sin conversión previa a otros intermediarios activos. Alternativamente, la observación de que los esteroides que inhiben la síntesis de progesterona en respuesta a FSH son los mismos que pueden ser conjugados por las células granulosa, plantea la interesante posibilidad de un rol regulatorio de los conjugados de andrógeno en las funciones foliculares.

La modulación de la síntesis de C_{21} -esteroides por andrógenos es otro ejemplo de interacción entre células granulosa y teca en la síntesis folicular de esteroides en el ovario porcino. Es interesante que, en folículos porcinos de tamaño mediano, las células granulosa pueden controlar la concentración intrafolicular de andrógenos proporcionando una parte del sustrato (pregnenolona) para la síntesis tecal de andrógenos y conjugando los andrógenos a iones sulfato. Estas interacciones demuestran la importancia de los mecanismos intraováricos en la regulación de la función folicular.

5.0 CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación indican que:

- 1) Las células granulosas porcinas sintetizan grandes cantidades de pregnenolona, siendo esta síntesis estimulada por FSH.
- 2) Medio usado por células granulosas cultivadas en presencia de FSH estimula la síntesis tecal de andrógenos.
- 3) Pregnenolona y progesterona pueden estimular la síntesis tecal de andrógenos.
- 4) Las células granulosas pueden conjugar los andrógenos a iones sulfato.
- 5) Los andrógenos aromatizables inhiben la síntesis de progesterona en respuesta a FSH en 24 horas de cultivo, actuando probablemente a nivel de la conversión de pregnenolona a progesterona.

De este modo, en el ovario porcino, en los estadios tempranos del desarrollo folicular preovulatorio, las células granulosas podrían regular la concentración intrafolicular de andrógenos:

- 1) Estimulando la producción tecal de andrógenos; 2) conjugando el andrógeno en exceso.

Se ha implicado a los andrógenos intraováricos en la regulación de la maduración folicular. Louvet y col. (132) observaron que la administración de hCG a ratas hembras inmaduras hipofisectomizadas, tratadas con estrógenos, conduce a atresia folicular, que puede ser revertida por antagonistas de la acción de los andrógenos (143). De este modo, la capacidad de las células responsables de la aromatización, las células granulosas, de controlar la cantidad de andrógeno libre dentro del folículo proveería un medio para seleccionar los folículos destinados a ovular o a sufrir atresia.

El hecho de que los andrógenos (Δ^4 -androstenediona y testosterona) inhiban la conversión de pregnenolona a progesterona en respuesta a FSH sugiere la existencia de un mecanismo de retroalimentación positiva del andrógeno sobre su propia síntesis. El andrógeno podría luego ser aromatizado a estrógeno, que puede inhibir la subsiguiente síntesis tecal de andrógenos (39). Alternativamente, se puede especular que, cuando los niveles de andrógenos están en exceso a la cantidad que puede ser aromatizada, o cuando la concentración de estrógenos es alta, las células granulosas podrían conjugar el andrógeno. Observaciones recientes por Hillier y col. (144) sugieren que esto

último podría ocurrir; los niveles de andrógenos aromatizables libres en el fluido folicular de folículos humanos que contenían células granulosas con baja actividad de aromatasa fueron similares a aquellos de folículos preovulatorios con células con alta actividad de aromatasa.

El hecho de que los andrógenos, producidos por la teca, inhiban la síntesis de progesterona, sugiere que los andrógenos desempeñan un rol en el control intrafolicular de la esteroidogénesis en esta especie. Este rol podría involucrar la prevención de luteinización prematura de las células granulosas, particularmente antes de la inducción de la actividad de aromatasa y aumento concomitante en los niveles de 17β -estradiol. También es posible que los andrógenos aromatizables sean atretogénicos.

Como resultado de este y otros estudios, el modelo de biosíntesis de esteroides en folículos medianos de cerdo mostrado en la Figura 2 puede ser puesto al día como se representa en la Figura 33.

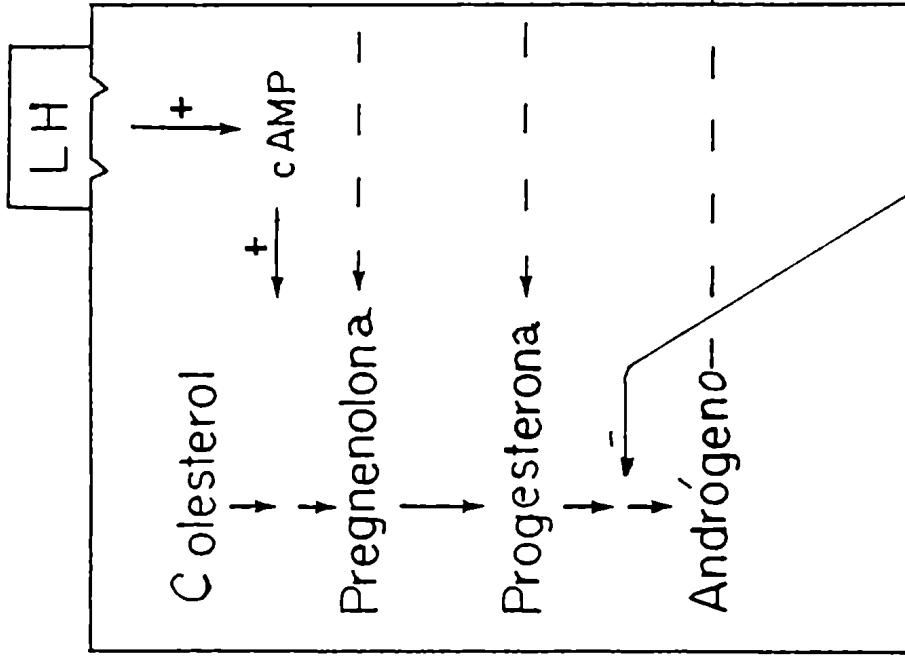
Las células tecales sintetizan andrógenos, predominantemente Δ^4 -androstenediona. Esta síntesis es estimulada por LH. Aunque las células tecales no poseen receptores para FSH, las células granulosas unen FSH y responden a esta hor -

Figura 33: Modelo para la esteroideogénesis en folículos porcinos de tamaño mediano.

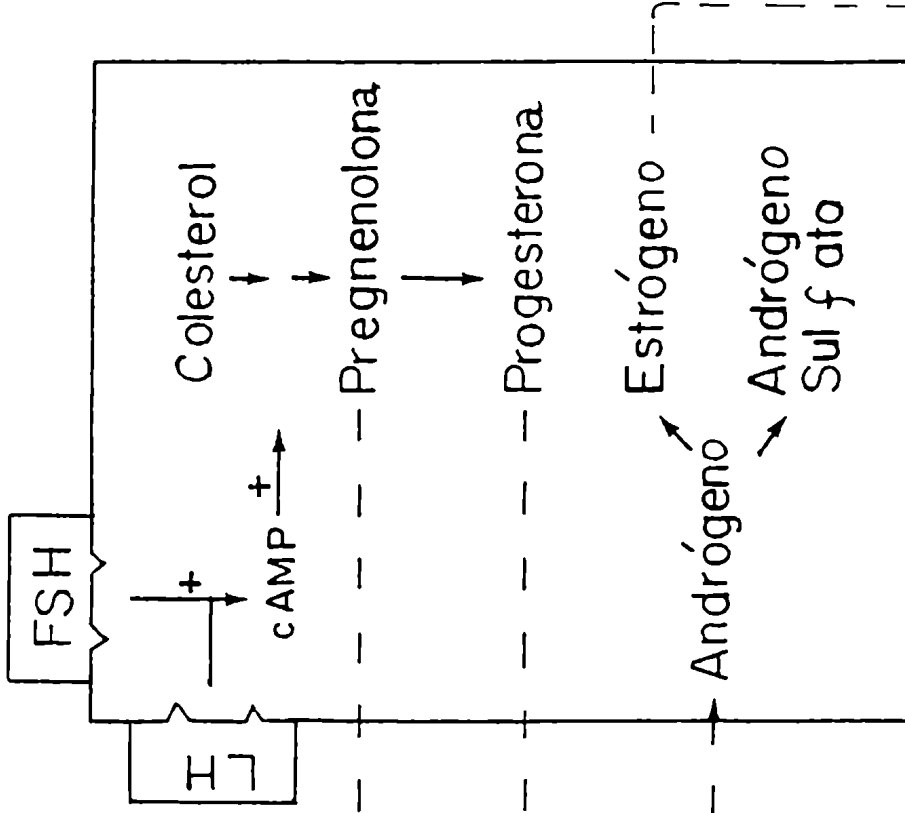
Las líneas enteras representan caminos biosintéticos y acciones intra-ováricas de hormonas: + estimulación; - inhibición.

Las líneas quebradas representan flujo intercelular de esteroides.

TECA



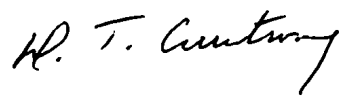
GRANULOSA



mona sintetizando grandes cantidades de pregnenolona y progesterona. Estos esteroides difunden a la capa teca donde sirven como sustratos para la síntesis de andrógenos en ausencia de LH.

Δ^4 -Androstenediona puede ser convertida a testosterona en la teca. Sin embargo, la teca no es eficiente en esta conversión. Así, la mayor parte de Δ^4 -androstenediona difunde a la capa granulosa donde es convertida a testosterona y luego a 17β -estradiol, o conjugada a iones sulfato.

Además del pasaje de sustratos de un tipo celular al otro, los esteroides sintetizados en un tipo celular pueden modular la producción de esteroides en el otro. Los estrógenos, producidos en las células granulosas, pueden inhibir la síntesis de andrógenos estimulada por LH. Los andrógenos, derivados de la teca, pueden inhibir la conversión de pregnenolona a progesterona en células granulosas estimuladas por FSH.



6.0 BIBLIOGRAFIA

- 1.- Lipner, H. (1973). En : Handbook of Physiology; Section 7 : Endocrinology. Editores: Greep, R.O. y Astwood, E.B. American Physiological Society, Washington, D.C., vol. II, parte I, pág. 409.
- 2.- Baker, T.G., Beaumont, H.M. y Franchi, L.L. (1969). J. Cell Sci. 4 : 655.
- 3.- Pool, W.R. y Lipner, H. (1969). Endocrinology 84 : 711.
- 4.- Baker, T.G. (1963). Proc. R. Soc. London. Ser B. 158 : 417.
- 5.- Peters, H. (1969). Acta Endocrinol. (Kbh) 62 : 98.
- 6.- Peters, H., Byskov, A.G. y Grinsted, J. (1978). Clinics. Endocr. Metab. 7 : 469.
- 7.- Eshkol, A. y Lunenfeld, B. (1972). En : "Gonadotropins". Editores : Savena, B.B., Beling, C.G. y Gandy, H.M. John Wiley and Sons, Inc., pág. 335.
- 8.- Richards, J.S. y Midgley, R. (1976). Biol. Reprod. 14 : 82.
- 9.- Bassett, D.L. (1943). Am. J. Anat. 73 : 251.
- 10.- Richards, J.S. (1975). Endocrinology 97 : 1174.
- 11.- Lindner, H.R., Tsafiriri, A., Lieberman, M.E., Zor, U. Koch, Y., Bauminger, S. y Barnea, A. (1974). Rec. Progr. Horm. Res. 30 : 79.
- 12 a.- Kalra, P.J., Krulich, L., Quijada, M., Kalra, S.P., Fawcett, C.P. y Mc Cann, S.M. (1971). En : "Hormonal Steroids". Editores: James, V.H.T. y Martini, L. Excerpta Medica, Amsterdam, pág. 708.

- 12 b.-Leung, P.C.K. y Armstrong, D.T. (1980). *Ann. Rev. Phys.* 42 : 71.
- 13.- Engel, L.L. (1973). En: *Handbook of Physiology, Section 7 : Endocrinology*. Editores: Greep, R.O. y Astwood, E.B. American Physiological Society, Washington, D.C., vol. II, parte I, pág. 467.
- 14.- Mc Guire, J.S., Hollis, V.W. Jr. y Tomkins, G.M. (1960) *J. Biol. Chem.* 235 : 3112.
- 15.- Schwarzel, W.C., Kruggel, W.G. y Brodie, H.J. (1973). *Endocrinology* 92 : 866.
- 16.- Hillier, S.G., van der Boogaard, A.M.J., Reichert, L.E. Jr. y van Hall, E.V. (1980). *J. Endocr.* 84 : 409.
- 17.- Nakano, R., Akahori, T., Katayama, K. y Tojo, S. (1977). *J. Reprod. Fert.* 51 : 23.
- 18.- Kolena, J. y Channing, C.P. (1972). *Endocrinology* 90 : 1543.
- 19.- Channing, C.P. y Seymour, J.F. (1970). *Endocrinology* 87 : 165.
- 20.- Channing, C.P. y Kammerman, S. (1973). *Endocrinology* 92 : 531.
- 21.- Schomberg, D.W. y Tyrey, L. (1972). *Biol. Reprod.* 7 : 127.
- 22.- Stouffer, R.L., Tyrey, L. y Schomberg, D.W. (1976). *Endocrinology* 99 : 516.
- 23.- Channing, C.P. y Kammerman, S. (1974). *Biol. Reprod.* 10 : 179.
- 24.- Bjersing, L. y Carstensen, H. (1964). *Biochim. Biophys. Acta* 86 : 639.
- 25.- Bjersing, L. y Carstensen, H. (1967). *J. Reprod. Fert.* 14 : 101.

- 26.- Bjersing, L. (1967). *Acta Endocrinologica Suppl.* 125 : 1.
- 27.- Channing, C.P. (1970). *Endocrinology* 87 : 156.
- 28.- Tsang, B.K., Moon, Y.S. y Armstrong, D.T. (1978). *Fed. Proc.* 37 : 723.
- 29.- Evans, G., Dobias, M., King, G.J. y Armstrong, D.T. (1981). *Biol. Reprod.* 25 : 673.
- 30.- Armstrong, D.T. y Dorrington, J.H. (1977). En : "Regulatory Mechanisms Affecting Gonadal Hormonal Action". Editores: Thomas, J.A. y Singhal, R.L. University Park Press, Baltimore, vol. 3, pág. 217.
- 31.- Anderson, L.D., Schaerf, F.W. y Channing, C.P. (1979). *Adv. Exp. Med. Biol.* 112 : 187.
- 32.- Dorrington, J.H., Moon, Y.S. y Armstrong, D.T. (1975). *Endocrinology* 97 : 1328.
- 33.- Erickson, G.F. y Hsueh, A.J.W. (1978). *Endocrinology* 102 : 1275.
- 34.- Stoklosowa, S., Bahr, J. y Gregoraszcuk, E. (1978). *Biol. Reprod.* 19 : 712.
- 35.- Haney, A.F. y Schomberg, D.W. (1981). *Endocrinology* 109 : 971.
- 36.- Eiler, H. y Nalbandov, A.V. (1977). *Endocrinology* 100 : 331.
- 37.- Armstrong, D.T., Weiss, T.J., Selstam, G. y Seamark, R. F. (1981). *J. Reprod. Fert. Suppl.* 30 : 143.
- 38.- Leung, P.C.K. y Armstrong, D.T. (1980). *Ann. Rev. Phys.* 42 : 71.
- 39.- Tsang, B.K., Leung, P.C.K. y Armstrong, D.T. (1979). *Molec. Cell. Endocr.* 14 : 131.

- 40.- Leung, P.C.K., Goff, A.K., Kennedy, T.G. y Armstrong, D.T. (1978). Biol. Reprod. 19 : 641.
- 41.- Leung, P.C.K. y Armstrong, D.T. (1979). Endocrinology 104 : 1411.
- 42.- Leung, P.C.K. y Armstrong, D.T. (1979) Biol. Reprod. 21: 1035.
- 43.- Goldenberg, R.L., Bridson, W.E. y Kohler, P.O. (1972). Biochem. Biophys. Res. Commun. 48 : 101.
- 44.- Schomberg, D.W., Stouffer, R.L. y Tyrey, L. (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun. 68 : 77.
- 45.- Haney, A.F. y Schomberg, D.W. (1978) Biol. Reprod. 19 : 242.
- 46.- Thanki, K.H. y Channing, C.P. (1976). Endocr. Res. Commun. 3 : 319.
- 47.- Thanki, K.H. y Channing, C.P. (1978). Endocrinology 103 : 74.
- 48.- Ledwitz-Rigby, F., Rigby, B.W., Gay, V.L., Stetson, M., Young, J. y Channing, C.P. (1977). J. Endocr. 74 : 175.
- 49.- Kraiem, Z., Druker, B. y Lunenfeld, B. (1978). J. Endocrinol. 78 : 161.
- 50.- Ledwitz-Rigby, F. (1980). Biol. Reprod. 23 : 324.
- 51.- Ledwitz-Rigby, F. y Rigby, B.W. (1977). J. Cell. Biol. 75 : 178 a.
- 52.- Darga, N.C. y Reichert, L.E. Jr. (1978). Biol. Reprod. 19 : 235.
- 53.- Yang, K.P., Samaan, N.A. y Ward, D.N. (1979). Endocrinology 104 : 552.

- 54.- Sakai, C., Channing, C.P. y Engel, B. (1977). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 155 : 373.
- 55.- Kumari, L., Tucker, S. y Channing, C.P. (1979). Biol. Reprod. 21 : 1043.
- 56.- Roy, A.B. (1960). Adv. in Enzymology 22 : 205.
- 57.- Baulieu, E. (1960). Compt. Rend. 251 : 1421.
- 58.- Baulieu, E., Corpéchet, C., Dray, F., Emiliozzi, P., Lébeau, M.C., Jarvis, P.M. y Robel, P. (1965). Rec. Progr. Horm. Res. 21 : 411.
- 59.- Burstein, S. y Dorfman, R.J. (1963). J. Biol. Chem. 238: 1656.
- 60.- Calvin, H.I., Van de Wiele, R.L. y Lieberman, S. (1963). Biochemistry 2 : 648.
- 61.- Calvin, H.I. y Lieberman, S. (1964). Biochemistry 3 : 259.
- 62.- Lébeau, M.C., Alberga, A. y Baulieu, E.E. (1964). Biochem. Biophys. Res. Commun. 17 : 570.
- 63.- Roberts, K.D., Bandi, L., Calvin, H.I., Drucker, W.D. y Lieberman, S. (1964). J. Am. Chem. Soc. 86 : 958.
- 64.- Weliky, I. y Engel, L.L. (1962). J. Biol. Chem. 237:2089.
- 65.- Ryan, K.J. y Smith, O.W. (1965). Rec. Progr.Horm. Res. 21 : 367.
- 66.- Domínguez, O.V., Loza, A.C., Rangel, C.L. y Zárate, T.A. (1970). Archs. Inv. Med. (Mex) 1 : 187.
- 67.- Notation, A.D. y Ungar, F. (1968). Can. J. Biochem. 46: 1185.
- 68.- Notation, A.D. y Ungar, F. (1972). Endocrinology 91:852.
- 69.- Fry, J.M. y Koritz, S.B. (1972). Endocrinology 91 : 852

- 70.- Domínguez, O.V., Loza, A.C., Morán, L.Z. y Valencia, A.S. (1974). *J. St. Biochem.* 5 : 867.
- 71.- Warren, J.C. y Timberlake, C.E. (1962). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 22 : 1148.
- 72.- Warren, J.C. y Timberlake, C.E. (1964). *Obstet. Gynecol.* 23 : 689.
- 73.- Koritz, S.B. y Kumar, A.M. (1970). *J. Biol. Chem.* 245 : 152.
- 74.- Domínguez, O.V., Valencia, S.A. y Loza, A.C. (1975). *J. St. Biochem.* 6 : 301.
- 75.- Notation, A.D. (1975). *J. Steroid Biochem.* 6 : 311.
- 76.- Wallace, E. y Silberman, W. (1964). *J. Biol. Chem.* 239: 2809.
- 77.- Holcenberg, J.S. y Rosen, S.W. (1965). *Archives Biochem. Biophys.* 110 : 551.
- 78.- Flickinger, G.L., Murarvec, T. y Touchstone, J.C. (1965) *Fed. Proc.* 24 : 162.
- 79.- Aakvaag, A. y Fylling, P. (1968). *Acta Endocrinologica* 57 : 447.
- 80.- Melville, E. y Braunsberg, H. (1973). *Biochem. Soc. Trans.* 1 : 757.
- 81.- Kalliala, K., Laatikainen, T., Luukkainen, T. y Vihko, R. (1970). *J. Clin. Endocr. Metab.* 30 : 533.
- 82.- Sturm, G. y Hannappel, E. (1978). *J. Endocr.* 79 : 291.
- 83.- Sturm, G., Stahler, E. y Daume, E. (1974). *J. Steroid Biochem.* 5 : 313.
- 84.- Sturm, G., Stahler, E. y Daume, E. (1975). *Acta Endocrinologica. Suppl.* 193 : 104.

- 85.- Sturm, G., Grosch, B., Daume, E., Stahler, E. y Buchholz, R. (1980). *J. Steroid Biochem.* 13 : 1401.
- 86.- Sandberg, E.C. y Jenkins, R.C. (1966). *Biochim. Biophys. Acta* 113 : 190.
- 87.- Oertel, G.W., Treiber, L. y Rindt, W. (1967). *Specialia* 15 : 97.
- 88.- Payne, A.H. y Mason, M. (1969). *Steroids* 13 : 213.
- 89.- Patwardhan, U. y Lanthier, A. (1977). *J. Endocr.* 75:445.
- 90.- Goldenberg, R.L., Vaitukaitis, J.L. y Ross, G.T. (1972). *Endocrinology* 90 : 1492.
- 91.- Payne, R.W. y Helbaum, A.A. (1955). *Endocrinology* 57 : 193.
- 92.- Hillier, S.G. y Ross, G.T. (1979). *Biol. Reprod.* 20 :261.
- 93.- Fortune, J.E. y Armstrong, D.T. (1978). *Endocrinology* 102 : 227.
- 94.- Moor, R.M. (1977). *J. Endocr.* 73 : 143.
- 95.- Tsang, B.K., Henderson, K.M. y Armstrong, D.T. (1979). *Am. J. Obstet. Gynecol.* 133 : 256.
- 96.- Walton, E.A. y Armstrong, D.T. (1981). *Biol. Reprod.* 25: 272.
- 97.- Inaba, T., Wiest, W.G. y Niswender, G.D. (1979). *Steroids* 34 : 663.
- 98.- Carr, B.R., Mikhail, G. y Flickinger, G.L. (1971). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33 : 358.
- 99.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R. J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193 : 265.
- 100.- Hobkirk, R. y Nilsen, M. (1970). *Analytical Biochem.* 37 : 337.

- 101.- Loriaux, D.L., Ruder, H.J. y Lipsett, M.B. (1971).
Steroids 18 : 463.
- 102.- Armstrong, D.T., Kraemer, M.A. y Hixon, J.E. (1975).
Biol. Reprod. 12 : 599.
- 103.- Steel, R.G.D. y Torrie, J.H. (1960). Principles and
Procedures of Statistics. Mc Graw-Hill, New York.
- 104.- Siegel, S. (1956). Nonparametric Statistics. Mc Graw-
Hill, New York.
- 105.- Suzuki, K., Kawakura, K. y Tamaoki, B. (1978).
Endocrinology 102 : 1595.
- 106.- Armstrong, D.T. (1979). Biol. Reprod. 21 : 1025.
- 107.- Ahmad, N. y Gower, D.B. (1968). J. Endocrinol. 108 :
233.
- 108.- Brodie, A.M.H., Wu, J.T., Marsh, D.A. y Brodie. M.J.
(1978). Biol. Reprod. 18 : 365.
- 109.- Channing, C.P. (1969). J. Endocrinol. 45 : 297.
- 110.- Makris, A. y Ryan, K.J. (1975). Endocrinology 96 : 694.
- 111.- Makris, A. y Ryan, K.J. (1980). Steroids 35 : 53.
- 112.- Erickson, G.F. y Ryan, K.J. (1976). Endocrinology 99 :
452.
- 113.- Fortune, J.E. y Armstrong, D.T. (1977). Endocrinology
100 : 1341.
- 114.- Tsang, B.K., Moon, Y.S., Simpson, C.W. y Armstrong,
D.T. (1979). J. Clin. Endocrinol. Metab. 48 : 153.
- 115.- Channing, C.P., Schaerf, F.W., Anderson, L.D. y
Tsafriri, A. (1980). En : Reproductive Physiology III -
International Review of Physiology, vol. 3 Editor: Greep,
R.O. University Park Press, Baltimore, pág. 117.

- 116.- Erickson, G.F. y Hsueh, A.J.W. (1978). *Endocrinology* 103 : 1960.
- 117.- Tsafriri, A. y Channing, C.P. (1975). *Endocrinology* 96: 922.
- 118.- Younglai, E.V. y Short, R.V. (1970). *J. Endocr.* 47 : 321.
- 119.- Lacroix, E., Eechaute, W. y Leusen, I. (1974). *Steroids* 23 : 337.
- 120.- Fortune, J.E. (1981). *Biol. Reprod.* 24, Suppl n° 1: 39 A.
- 121.- Makris, A. y Ryan, K.J. (1977). *Steroids* 29 : 65.
- 122.- Hobkirk, R. y Davidson, S. (1971). *J. Chromat.* 54 : 431.
- 123.- Hobkirk, R., Freeman, D.J., Harvey, P.R.C., Nilsen, M. y Jennings, B. (1977). *Can. J. Biochem.* 55 : 390.
- 124.- Mc Natty, K.P. (1978). En: "The Vertebrate Ovary". Editor: Jones, R.E. Plenum Press, New York, pág. 215.
- 125.- Bradlow, H.L. (1970). En: "Chemical and Biological Aspects of Steroid Conjugation". Editores: Bernstein, S. y Solomon, S. Springer-Verlag, New York-Heidelberg-Berlin, pág. 131.
- 126.- Jakoby, W.B., Sekura, R.D., Lyon, E.S., Marcus, C.J. y Wang, J.L. (1980). En: "Enzymatic Basis of Detoxication" Editor: Jakoby, W.B. Academic Press, New York, vol 2, pág. 199.
- 127.- Kolena, J. y Channing, C.P. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 252 : 601.
- 128.- Armstrong, D.T. y Dorrington, J.H. (1976). *Endocrinology* 99 : 1411.
- 129.- Nimrod, A. y Lindner, H. (1976). *Molec. Cell. Endocr.* 5 : 315.

- 130.- Lucky, A.W., Schreiber, J.R., Hillier, S.G., Schulman, J.D. y Ross, G.T. (1977). *Endocrinology* 100 : 128.
- 131.- Nimrod, A., Rosenfeld, R.L. y Otto, P. (1980). *J. Steroid Biochem.* 13 : 1015.
- 132.- Louvet, J.P., Harman, S.M. y Ross, G.T. (1975). *Endocrinology* 97 : 1179.
- 133.- Channing, C.P., Anderson, L.D. y Batta, S.K. (1978). *Clinics in Obst. Gyn.* 5 : 375.
- 134.- Batta, S.K., Coulston Wentz, A. y Channing, C.P. (1980). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50 : 274.
- 135.- Koritz, S.B., Yun, J. y Ferguson, J.J. (1968). *Endocrinology* 82 : 620.
- 136.- Sulimovici, S. y Boyd, G.S. (1969). *European J. Biochem.* 7 : 549.
- 137.- Dorrington, J.H. y Armstrong, D.T. (1979). *Rec. Progr. Horm. Res.* 35 : 301.
- 138.- Wiener, M. y Allen, S.H.G. (1967). *Steroids* 9 : 567.
- 139.- Townsley, J.D. (1975). *Acta Endocrinologica* 79 : 740.
- 140.- Ainsworth, L., Tsang, B.K., Downey, B.R., Marcus, G. Y. y Armstrong, D.T. (1980). *Biol. Reprod.* 23 : 621.
- 141.- Fortune, J.E. y Hansel, W. (1979). *Endocrinology* 104 : 1834.
- 142.- Schreiber, J.R., Reid, R. y Ross, G.T. (1976). *Endocrinology* 98 : 1206.
- 143.- Louvet, J.P., Harman, S.M., Schreiber, J.R. y Ross, G.T. (1975). *Endocrinology* 97 : 366.
- 144.- Hillier, S.G., Reichert, L.E. Jr. y van Hall, E.V. (1981) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52 : 847.