

UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias

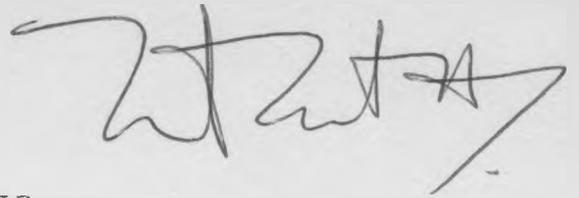
EFFECTOS HORMONALES EN LA CAPTACION
Y UTILIZACION DE GLUCOSA EN OOCITOS
DE *Xenopus laevis*

Tesis de Licenciatura para optar al grado de Licenciado
en Ciencias con Mención en Biología

María del Pilar Carvallo de Saint Quentin

Director de Tesis : Dra. Catherine Connelly

1980



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias

EFFECTOS HORMONALES EN LA CAPTACION Y UTILIZACION
DE GLUCOSA EN OOCITOS DE *Xenopus laevis*

Director de Tesis
Dra. Catherine Connelly

Tesis de Licenciatura para optar al grado de Licenciado
en Ciencias con Mención en Biología

María del Pilar Carvallo de Saint Quentin

AGRADECIMIENTOS

Quiero hacer known en forma muy especial a la Dirección General de Salud y al Dr. Jorge Alfaro, mis agradecimientos por la ayuda en el traslado y la asistencia brindada así como al personal que me acompañó en este viaje.

Agradezco también muy especialmente a la Dra. María Teresa por su amabilidad y ayuda en la realización de este estudio.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio del Hospital me hago presente muy especialmente por su constante colaboración durante la realización de este estudio.

Agradezco también a los colaboradores del laboratorio, Dra. María Arango y Dra. Ana Lidia por su desinteresada colaboración durante el desarrollo de este estudio.

A todos los miembros del Departamento de Epidemiología de la Facultad de Medicina Sede Norte, así particularmente por todas las facilidades que me otorgaron durante la realización de este estudio, particularmente al Dr. Lívior Gil, Director del Departamento durante mi estancia.

Finalmente, agradezco al Sr. José Manuel por su colaboración en la realización de las figuras.

AGRADECIMIENTOS

Quiero hacer llegar en forma muy especial a la Dra. Catherine Connelly y al Dr. Jorge Allende, mis agradecimientos por la valiosa dirección y la excelente formación que recibí de ellos durante el desarrollo de esta tesis.

Agradezco también muy especialmente a la Dra. Adela Tarragó por su apreciada ayuda en la revisión de este escrito.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio les hago llegar mi más sincero reconocimiento por su constante estímulo tanto en lo científico como en lo personal.

Agradezco también a las secretarias del laboratorio, Sra. Marta Arteaga y Sra. Ana Díaz por su desinteresada colaboración durante el transcurso de esta tesis.

A todos los miembros del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina Sede Norte, mi gratitud por todas las facilidades que me otorgaron durante la realización de este trabajo, particularmente al Dr. Lionel Gil, Director del Departamento durante ese período.

Finalmente, agradezco al Sr. José Mondaca por su colaboración en la confección de las figuras.

ABREVIATURAS

cAMP	Adenosín 3'5'- monofosfato cíclico
Ci	Curie
FSH	Hormona folículo estimulante
hCG	Gonadotropina coriónica humana
LH	Hormona luteinizante
Megluc	3-O-metil-glucosa
RNA	Acido ribonucleico
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
tRNA	Acido ribonucleico de transferencia
S	Coefficiente de sedimentación
Tris	Tris- (hidroximetil) -aminometano
rpm	Revoluciones por minuto

RESUMEN

Se ha estudiado la captación de $[^{14}\text{C}]$ - glucosa y de un análogo no metabolizable, la $[^{14}\text{C}]$ -3-0-metil glucosa, por oocitos de Xenopus laevis que han sido sometidos a diferentes inductores de la maduración meiótica.

La gonadotropina coriónica humana (hCG) y la hormona luteinizante (LH), de bovino que causan maduración en los oocitos, producen un claro estímulo en la entrada de ambos azúcares a estas células. Sin embargo, otras hormonas como la progesterona, que también es un potente inductor de la maduración, o como la insulina o la hormona folículo estimulante, que no gatillan dicho fenómeno, no causan un estímulo similar en la captación de azúcares por los oocitos. El estímulo causado por hCG se produce a los 10 minutos de tratamiento hormonal y es observable en un amplio rango de concentraciones exógenas de estos nutrientes (0,1 mM - 10 mM). Las concentraciones de hCG requeridas para obtener el máximo efecto sobre la entrada de azúcares es muy variable en las diferentes estaciones del año y también en los diferentes animales. Sin embargo, estas concentraciones hormonales (10 - 200 UI/ml) son solamente dos a tres veces mayores que las requeridas para inducir maduración en células provenientes de un mismo ovario.

El tratamiento con LH y hCG causa estímulo en la captación de ambos azúcares radiactivos en oocitos en estados intermedios de la oogénesis (estados III al V según Dumont) a pesar de que estas células no son capaces de iniciar el proceso de maduración.

Otro cambio importante en la entrada de azúcares a través de la membrana del oocito ocurre seis a ocho horas después de inducir la maduración de oocitos crecidos (estado VI) por medio de hCG o de progesterona. En ese período, que es coincidente con la ruptura de la vesícula germinal, se observa una drástica caída en la captación de azúcares. En el caso de los oocitos tratados con hCG los niveles de entrada de azúcares disminuyen muy por debajo de los niveles basales obtenidos en oocitos no tratados con la hormona. Esta disminución en la captación de nutrientes no se observa al tratar oocitos de estado V con las mismas hormonas.

Se ha evidenciado que al menos el 90% de la glucosa que entra al oocito, ya sea tratado o no tratado con la hormona durante 30 minutos se incorpora al glicógeno celular.

SUMMARY

The uptake of $[^{14}\text{C}]$ - glucose or of its non-metabolizable analogue $[^{14}\text{C}]$ -3-0-methylglucose has been studied using Xenopus laevis oocytes that have been treated with different inducers of meiotic maturation.

Human chorionic gonadotropin (hCG) or bovine luteinizing hormone (LH), which can induce oocyte maturation cause a clear stimulus in the uptake of both sugars into these cells. However other hormones such as progesterone, which is also a potent inducer of oocyte maturation, or like insulin or follicle stimulating hormone which do not trigger maturation, do not increase in a similar fashion the sugar transport in these cells. The stimulus caused by hCG is apparent 10 minutes after treatment with the hormone and can be observed over a wide range of sugar concentrations (0,1 mM - 10 mM). The amount of hCG required to give a stimulus of the sugar uptake is quite variable with the seasons of the year and also between different animals, however, these hormonal concentrations (10 - 200 UI/ml) are only two or three fold higher than those required to trigger maturation in oocytes from the same ovaries.

LH and hCG treatment stimulates the uptake of both radioactive sugars in oocytes of intermediate stages of oogenesis (stages III to V according to Dumont) in spite of the fact that these oocytes are not capable of undergoing maturation.

Another important change in the entry of the sugars across the oocyte membrane occurs 6-8 hours after inducing maturation of full grown oocytes (stage VI) either with hCG or with progesterone. At this time, which coincides with the breakdown of the germinal vesicle, a drastic drop in the uptake of exogenous sugars is observed. In the case of oocytes treated with hCG the levels of the sugar transport fall well below the basal levels obtained with oocytes not treated with the hormone. This decrease in the uptake of nutrients is not observed upon treatment of intermediate oocyte (stage V) with the same hormones.

It has been found that at least 90% the glucose taken up by oocytes, be it either control or stimulated by treatment for 30 minutes with hCG, is incorporated into cellular glycogen.

INTRODUCCION

El anfibio ofrece un excelente sistema modelo para el estudio de diversos procesos fisiológicos y celulares. Entre los procesos celulares podemos destacar los que ocurren durante el desarrollo de las células germinales u oogénesis.

La formación del huevo o proceso de oogénesis involucra la acumulación de una gran cantidad de macromoléculas como DNA, RNA, proteínas y otros nutrientes en los oocitos. Estos componentes son utilizados durante la iniciación del desarrollo y en la embriogénesis, después de la fecundación. Durante su crecimiento el oocito de la rana Xenopus laevis aumenta su volumen en cien mil veces, llegando a tener 1 μ l. Su núcleo, llamado vesícula germinal, es de gran tamaño, ocupa un décimo del volumen celular y tiene mas de 1000 nucléolos que sintetizan activamente RNA ribosomal.

El oocito sufre un proceso de meiosis al final de la oogénesis deteniéndose en la primera profase meiótica en la cual puede permanecer durante varias semanas o meses, hasta que un aumento

en la concentración de hormona pituitaria en la sangre gatilla la llamada maduración meiótica. Este proceso gatillado por hormonas permite que el oocito continúe su meiosis hasta alcanzar la segunda metafase. En este momento el oocito suelta la capa de células foliculares que lo rodea, es liberado del ovario de la rana, y se transforma en un huevo que puede ser fecundado (1).

El proceso de ovogénesis:

La ovogénesis en el ovario de la rana Xenopus laevis, es un proceso continuo y asincrónico; por lo tanto en el ovario de este anfibio se encuentran oocitos de todos los estados de desarrollo durante toda la vida adulta de la rana, salvo en aquellas hembras que han ovulado recientemente. Los oocitos que pueden ser ovulados son aquellos de mayor tamaño, es decir entre 1,2 y 1,3 mm de diámetro y han sido denominados según Dumont como oocitos de estado VI de desarrollo (2). En condiciones de laboratorio se puede obtener una nueva población de oocitos de estado VI luego de seis a siete semanas de ocurrida la ovulación (2).

Dumont (2) clasificó los oocitos de Xenopus laevis en seis estados de desarrollo según sus características morfoló

gicas y metabólicas.

Los oocitos de menor tamaño, son llamados oocitos de estado I, tienen un diámetro entre 50 y 300 μ y son transparentes. Los oocitos de estado II presentan un citoplasma opaco y de color blanco y su diámetro es de 300 a 450 μ . El comienzo del estado III de desarrollo del oocito está marcado por dos eventos importantes: por un lado se observa una visible pigmentación del oocito y por otro una captación y acumulación de vitelo, que es transportado al ovario por la sangre desde el hígado de la rana. En este estado el oocito tiene un diámetro de 450 a 600 μ . A medida que el oocito continúa su desarrollo el pigmento se reparte hasta que se puede distinguir perfectamente entre el polo animal, de color café oscuro, y el polo vegetal, de color amarillo. Estos oocitos corresponden al estado IV de desarrollo; en ellos se observa un gran aumento en la captación de vitelo (3), que es adquirido principalmente por micropinocitosis (4); el diámetro de los oocitos de estado IV varía entre 600 y 800 μ . Cuando el oocito alcanza un diámetro de alrededor de 1 mm, es llamado oocito de estado V de desarrollo; la pigmentación es homogénea en cada polo y aún tiene una activa acumulación de vitelo aunque menos que en los oocitos de estado IV.

El oocito completa finalmente su desarrollo al alcanzar el estado VI, con un diámetro de 1,2 a 1,3 mm, disminuyendo en forma considerable la captación de vitelo (3).

La transcripción de diferentes RNAs varía también notoriamente durante la ovogénesis. Aparentemente en los estados previtelogénicos (I al III) se sintetizan mRNAs, tRNAs y RNAs de 5S, mientras que en los últimos estados (IV al VI) se sintetizan principalmente los rRNAs catalizados por la RNA polimerasa I de origen nuclear (5).

El proceso de maduración del oocito

a) Qué es la maduración:

Como ya se dijo, cuando el oocito ha alcanzado su máximo desarrollo, o estado VI, detiene su crecimiento permaneciendo en la profase de la primera división meiótica, y requiere de un estímulo hormonal para completar la primera y la segunda división meiótica. En Xenopus laevis, la maduración meiótica alcanza la metafase de la segunda división meiótica, y prepara al oocito para la fecundación.

La maduración, durante la cuál el oocito se prepara para la fecundación y el desarrollo del embrión, produce una reactivación de los procesos metabólicos que han disminuído levemente en el oocito de estado VI. Luego de producirse este aumento, la actividad metabólica disminuye nuevamente y el oocito permanece en un nuevo estado de latencia hasta la fecundación (1).

b) Inducción de la maduración:

Es bastante conocido ya, que al administrar hormonas gonadotrópicas a ranas adultas, se produce la maduración de sus oocitos y la ovulación. En los vertebrados las gonadotropinas son secretadas por la glándula pituitaria o hipófisis. En anfibios se ha encontrado dos tipos de hormonas polipeptídicas, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), aunque aún no han sido caracterizadas químicamente (6).

Se puede inducir la maduración en oocitos de anfibio aislados, agregando extracto de glándula pituitaria, hormonas gonadotrópicas o progesterona al medio de incubación (7). En Xenopus laevis, luego de seis a ocho horas se observa la aparición de un punto blanco en polo animal del oocito y por disección bajo la lupa se puede

observar que este fenómeno corresponde a la desaparición de la membrana de la vesícula germinal o núcleo.

Existen diferencias importantes en la inducción de la maduración por hormonas gonadotrópicas y por progesterona. Se ha encontrado que las gonadotropinas no inducen la maduración en oocitos desprovistos de sus células foliculares (8). Además la inducción de maduración por estas hormonas polipeptídicas es completamente bloqueada por actinomicina D, un inhibidor de la transcripción (9). En cambio la progesterona no requiere de la presencia de las células foliculares para su acción y la actinomicina D no inhibe la inducción de maduración por esta hormona (9).

Por otra parte se ha encontrado que la inducción de la maduración por ambas clases de hormonas requiere de la síntesis proteica (9), proceso que se activa considerablemente durante la maduración. (10 y 11).

También es posible inducir la maduración de los oocitos inyectándoles citoplasma de un oocito que ha madurado por acción hormonal. Este fenómeno estaría mediado por unas proteínas, sintetizadas durante la maduración, que tienen la actividad de un "factor promo-

tor de la maduración" (12 y 13).

El mecanismo molecular involucrado en el proceso de maduración no ha podido ser esclarecido aún, pero las evidencias entregadas por los numerosos estudios realizados acerca de este proceso parecen indicar que las hormonas gonadotrópicas actúan sobre las células foliculares, que rodean al oocito, produciéndose la síntesis de progesterona o de una hormona similar a ésta, que a su vez induciría la maduración de los oocitos por medio de un "factor promotor de la maduración" (8, 12, 13 y 14).

La influencia del calcio y de los nucleótidos en la acción hormonal es un hecho bastante conocido aunque su mecanismo de acción no está aún esclarecido. Las observaciones hechas en los últimos años sobre el rol del calcio en la maduración muestran que la presencia de este ión es indispensable para dicho proceso y que el ionóforo A 23187, específico para calcio, induce la maduración en oocitos de anfibio (15). Por otra parte se ha determinado que el cAMP también estaría involucrado en el proceso de maduración ya que se observó que luego de la incubación de los oocitos con progesterona bajan los niveles de cAMP aumentando nuevamente en el momento de la ruptura de la vesícula

germinal (16). Se ha observado además que teofilina y papaverina, inhibidores de la fosfodiesterasa, inhiben la maduración (16). Maller y Krebs han encontrado que la inyección de la subunidad regulatoria de la proteína quinasa que une cAMP induce la maduración de los oocitos, en cambio la inyección de la subunidad catalítica inhibe la maduración inducida por progesterona (17).

c) Cambios en la permeabilidad de la membrana del oocito durante la maduración:

El proceso de maduración involucra cambios importantes en el metabolismo del oocito desde que éste toma contacto con la hormona hasta que ocurre el rompimiento de la vesícula germinal. Durante este proceso el oocito tiene la última oportunidad de captar nutrientes para su desarrollo posterior, antes de desprenderse del ovario y ser fecundado.

Experimentos realizados por Hallberg y Smith (11), en oocitos en estado I a V, y por Otero y colaboradores (10) en oocitos en estado VI de desarrollo muestran que la hCG causa un gran estímulo en la captación de aminoácidos. Otros agentes que inducen la maduración, como la progesterona y el ión lantano (18), no producen es

tímulo en la captación de aminoácidos (10). El incremento en la entrada de aminoácidos exógenos causado por hCG está acompañado de un aumento en forma considerable, de la incorporación de éstos a proteínas, durante las primeras horas de incubación con la hormona (10). Este aumento en la entrada de aminoácidos decrece al producirse la ruptura de la vesícula germinal (Otero, comunicación personal). Un efecto similar se observa en oocitos que han sufrido maduración por inyección del factor promotor de la maduración. En este caso se detectó una caída en la captación de vitelogenina exógena en aquellos oocitos que han sufrido maduración (19).

El transporte de glucosa

Como hemos visto, los procesos de transporte son de gran importancia durante la oogénesis y la maduración de los oocitos.

Se han hecho interesantes hallazgos en relación a la captación de proteínas por pinocitosis, principalmente vitelogenina, y aminoácidos; pero hasta el momento hay muy poca información acerca del transporte de glucosa en oocitos.

El estudio de la captación de azúcares en los oocitos y de su destino metabólico una vez que han entrado a la célula, parece, por lo tanto, ser necesario para una mejor comprensión de los procesos moleculares que acompañan la acción hormonal.

Brachet y colaboradores han encontrado que en oocitos de Rana pipiens se produce una acumulación de gránulos de glicógeno cerca del núcleo y que al disolverse la membrana nuclear durante la maduración estos gránulos rodean al nucléolo (20).

En otros sistemas se han descrito una gran cantidad de evidencias experimentales que indican la existencia de proteínas en la membrana plasmática que estarían especializadas en el transporte de metabolitos como glucosa y aminoácidos (21).

El transporte de glucosa en células de mamíferos puede clasificarse en dos grandes categorías:

- en la primera categoría, de la cual las células eritroides son un buen ejemplo, el transporte presenta, a) una baja especificidad para los azúcares, b) una independencia de la concentración de sodio, c) una baja sensibilidad a florizina, un inhibidor competitivo del transporte de glucosa y d) características de un mecanismo de transporte facilitado.

- la segunda categoría de la cual el intestino y el riñón son buenos ejemplos, muestran un transporte con, a) una alta especificidad para glucosa, b) una dependencia de la concentración de sodio, c) una gran sensibilidad a la inhibición por florizina y d) características de transporte activo, es decir en contra de un gradiente de concentración (21).

Numerosos estudios hechos en relación a la especificidad del transporte de glucosa en riñón, indican que florizina y 3-0-metil glucosa, un análogo no metabolizable de la glucosa, inhiben en forma competitiva el transporte de glucosa, y que aparentemente los dos azúcares compartirían el mismo transportador (21).

Aunque numerosos autores han descrito la existencia de un mecanismo de transporte de glucosa dependiente de la concentración de sodio (22), se ha encontrado en músculo que el transporte de glucosa y de 3-0-metil glucosa es activado por un aumento en la concentración intracelular de calcio. Este fenómeno también causa un estímulo en la salida de 3-0-metil glucosa. Además el transporte de glucosa en este tejido es inhibido por florizina (23).

En células 3T3 de ratón se encontró igualmente que el transporte de glucosa y de 3-0-metil glucosa es estimulado por

calcio y es dependiente de la concentración de fosfatos en el medio de incubación (24).

La insulina tiene un efecto estimulante sobre el transporte de glucosa en algunos tejidos como se ha demostrado a través de numerosos trabajos realizados en adipocitos (25), células de corazón (26), y tejido adiposo de epididimo (27 y 28). Aunque se han realizado estudios sobre el mecanismo de acción de la insulina en el transporte de glucosa en estos sistemas, no se ha podido aún establecer un modelo de acción para este fenómeno. En numerosos trabajos en que se ha estudiado el efecto de insulina en el transporte de glucosa, se ha encontrado que la hormona produce un estímulo en la entrada del azúcar aumentando la velocidad máxima del sistema sin afectar el K_T , es decir la concentración de glucosa a la cual se obtiene la mitad de la velocidad máxima en el transporte (25, 26, 29, 30 y 31). Experimentos específicos para cuantificar el número de " transportadores " activos en la membrana plasmática de células adiposas de rata y en corazón, indican que la insulina estimularía el transporte de glucosa activando sistemas transportadores de la membrana lo que se refleja en un aumento en la velocidad máxima (26 y 29).

Sin embargo los estudios realizados por Croford y colaboradores (27) parecen indicar que el principal efecto de insulina sobre el transporte de glucosa es disminuir el K_T aparente para el sistema transportador.

Realizando estudios del efecto de insulina en el transporte de 3-0-metil glucosa en adipocitos, se encontró que la hormona también tiene un efecto estimulante sobre la salida de este análogo de glucosa.

Los estudios realizados en esta tesis, se refieren al efecto de diversas hormonas como hCG, LH, FSH, progesterona e insulina sobre la captación y el metabolismo de glucosa en oocitos de Xenopus laevis, con el fin de determinar los cambios que ocurren en estos procesos durante la ovogénesis y la maduración.

Paralelamente se han hecho estudios con 3-0-metil glucosa, que como ya se dijo es un análogo no metabolizable de glucosa, con el fin de analizar exclusivamente el fenómeno de transporte, en forma independiente del metabolismo.

METODOS

Obtención de los oocitos de Xenopus laevis:

Las hembras adultas de Xenopus laevis provienen del "South African Snake Farm", Cape Province, Sud Africa, y se mantienen en cautiverio a una temperatura entre 18 y 22 grados.

Para extraer los oocitos se anestesió la rana sumergiéndola en un baño de agua con hielo durante aproximadamente 30 minutos. Luego se operó haciendo una pequeña incisión en el abdomen para extraer el ovario o un trozo de éste, luego se suturó el animal el cual puede ser operado nuevamente al cabo de unos meses.

Una vez extraído el ovario se colocó en una solución salina descrita por Barth, cuya composición es : NaCl 88mM; NaHCO₃ 2,4 mM; CaCl₂ 0,40 mM; MgSO₄ 0,82 mM; KCl 1 mM; Ca(NO₃)₂ 0,33 mM; Tris-HCl 20 mM; pH 7,5; 10 ug/l de penicilina y 10 ug/l de estreptomomicina. En esta solución los oocitos pueden conservarse en buenas condiciones durante cinco días a 4 grados.

Los oocitos se separaron del ovario manualmente con pinzas de relojero DUMONT # 5 observándolos bajo una lupa NIKON con

un aumento de 0,8 veces. Para los experimentos de esta tesis se utilizaron oocitos de diferentes estados según la clasificación de Dumont (2). Para ello se midió el diámetro de los oocitos directamente en una escala ocular y sólo se eligieron aquellos que presentaban una pigmentación homogénea y normal.

Detección de maduración

Se incubaron grupos de 50 oocitos en 3 ml de solución salina que contenía hCG a una concentración de 100 UI/ml o progesterona a una concentración final de 10^{-6} M, con el fin de inducir la maduración in vitro. Luego de una incubación de ocho horas a 21° se agregaron 300 µl de ácido tricloroacético al 50% para fijar los oocitos precipitando sus proteínas. Se abrió la parte superior del polo animal y de esta forma se pudo apreciar la presencia o ausencia del núcleo utilizando esto último como criterio de maduración. De esta forma se comprobó que aquellos oocitos que carecen de núcleo presentan un punto blanco en el polo animal. Para algunos ensayos se utilizó este último criterio para deter

minar la maduración de los oocitos.

Captación de glucosa y de 3-0-metil glucosa

Se incubaron grupos de cinco oocitos en 50 μ l de solución salina con $[^{14}\text{C}]$ - glucosa o $[^{14}\text{C}]$ - metil glucosa a 22°. Una vez finalizada la incubación con el azúcar radiactivo se detuvo la reacción en frío agregando 3 ml de solución salina. Se pasó esta solución con los oocitos a través de un filtro de fibra de vidrio ubicado sobre un embudo, eliminando por filtración el exceso de líquido, y después se lavaron los oocitos con 20 ml de solución salina. Se doblaron los filtros y se aplastaron los oocitos. Luego se contó la radiactividad presente en los oocitos, en un sistema de centelleo.

Para probar la eficiencia de este método se inyectó 2.000 cpm de $[^{14}\text{C}]$ - glucosa que luego se midieron por el método descrito, recuperando el 100% de la cantidad de glucosa radiactiva inyectada.

Para los ensayos en que se estudió un efecto hormonal sobre el transporte de azúcares se preincubaron los oocitos con hor

mona (hCG, LH, FSH, progesterona o insulina) antes de agregar el azúcar radiactivo. En cada ensayo se agregaron 800.000 cpm de $[^{14}\text{C}]$ - glucosa o $[^{14}\text{C}]$ -3-0-metil glucosa. Los controles realizados a 0° mostraron un nivel de incorporación similar al tiempo cero de incubación con la glucosa radiactiva; es decir entre 100 y 150 cpm.

Microinyección de los oocitos

Los ensayos de microinyección de los oocitos se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Gurdon (32).

Incorporación de glucosa a glicógeno

Una vez que la glucosa ha entrado al oocito ya sea por microinyección o por transporte desde el medio de incubación, se colocaron los oocitos en una solución de KOH al 30% (5N), y se calentaron en baño María durante 45 minutos. Se dejó enfriar y se agregaron 25 μl de glicógeno de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,1 ml de Na_2SO_4 al 2%, y 1,8 ml de etanol al 95%; se dejó durante 20 horas y se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos, se lavó el precipitado con 2 ml de agua, se agregaron 6 ml de etanol al 95% y se dejó nuevamente durante 6 horas. Finalmente se lavaron muestras con etanol al 75%, recogiendo el glicógeno precipitado en

filtros de fibra de vidrio. Se contaron los filtros en un sistema de cen
telleo.

Reproducibilidad de los resultados:

En los experimentos realizados a lo largo del año se encontró una gran variación, en el nivel de entrada de glucosa, entre 100 y 350 pmoles; y en el porcentaje de estímulo por la hormona, entre un 100 y un 350%. Sin embargo, todos los experimentos presentados se repitieron al menos cinco veces a lo largo del año obteniéndose resul
tados reproducibles. Solamente en la época de otoño (marzo y abril) se observó en forma general que los oocitos no responden a la hormona, lo que sin duda refleja el estado nutricional y hormonal de los animales.

MATERIALES

Baker Chemical Co., Phillipsburg, N.J., U.S.A

- ácido tricloroacético

Calbiochem, San Diego, California, U.S.A.

- Progesterona

New England Nuclear, Boston, Mass., U.S.A.

- [^{14}C] - D - glucosa
- [^{14}C] -3-0 metil - D - glucosa
- Onmifluor

N.V. Organon Oss. Holland

- Gonadotropina coriónica humana

Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A

- Tris - (hidroximetil) - aminometano
- Estreptomicina
- Penicilina

Shell (Chile)

- Tolueno

Servicio Nacional de Salud (Chile)

- Etanol

Whatman W., and Balston R., Ltd. Inglaterra

- Filtros de fibra de vidrio

Las sales de uso común fueron obtenidas de: Baker; Sigma y Merck, Darmstadt, Alemania.

Los siguientes reactivos fueron gentilmente donados por:

- glicógeno (sigma) Dr. Enrique Figueroa, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Norte, Santiago.
- Insulina humana pura Dr. Armando Foradori, Hospital Clínico Universidad Católica de Chile.

- 3-O-metil-D-glucosa (sigma) Dr. Tito Ureta, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Florizina (Floretina-2- β -D-glucósido, Sigma) Dr. Fernando Zambrano, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- LH, FSH (puras) National Institut of Health, National Pituitary Agency, Distributed by NIAMDD.

U.S.A.

RESULTADOS

Para estudiar el efecto hormonal sobre el transporte de glucosa es necesario conocer previamente algunos parámetros de importancia sobre las condiciones experimentales apropiadas para medir dicho efecto.

Algunas características generales de la entrada de glucosa

La figura 1 muestra la captación de $[^{14}\text{C}]$ - glu cosa y $[^{14}\text{C}]$ -3-0-metil glucosa a diferentes tiempos de incubación por los oocitos. Los resultados demuestran que a la concentración de glúci-do utilizada, la entrada de ambos metabolitos es lineal durante 60 minu tos. Basándose en este experimento, todos los estudios posteriores (a me nos que se indique lo contrario) se hicieron incubando los oocitos duran te 30 minutos con el azúcar radiactivo con el fin de estudiar los cambios en las velocidades iniciales de captación.

En la figura 2 se muestra el efecto que se tiene al preincubar los oocitos con 100 UI/ml de hCG durante varios tiempos previos a la incubación de 30 minutos con el azúcar. En este experimen to se muestra que la adición de hCG estimula en aproximadamente un 200%

la captación de glucosa. También es evidente que la influencia del tiempo de preincubación es mínima ya que la adición de la hormona 0,5 minuto antes de agregar el azúcar ya da un efecto significativo, alcanzándose el efecto máximo con 10 minutos de preincubación. Hay que destacar que en estos experimentos la hCG no se retiró del medio de incubación después de la preincubación y por lo tanto estaba actuando durante los 30 minutos en que los oocitos estuvieron en presencia del glúcido radiactivo.

En experimentos posteriores se preincubaron los oocitos durante 30 minutos con la hCG.

ENTRADA DE GLUCOSA (pmoles/5 ooc)

Figura 1

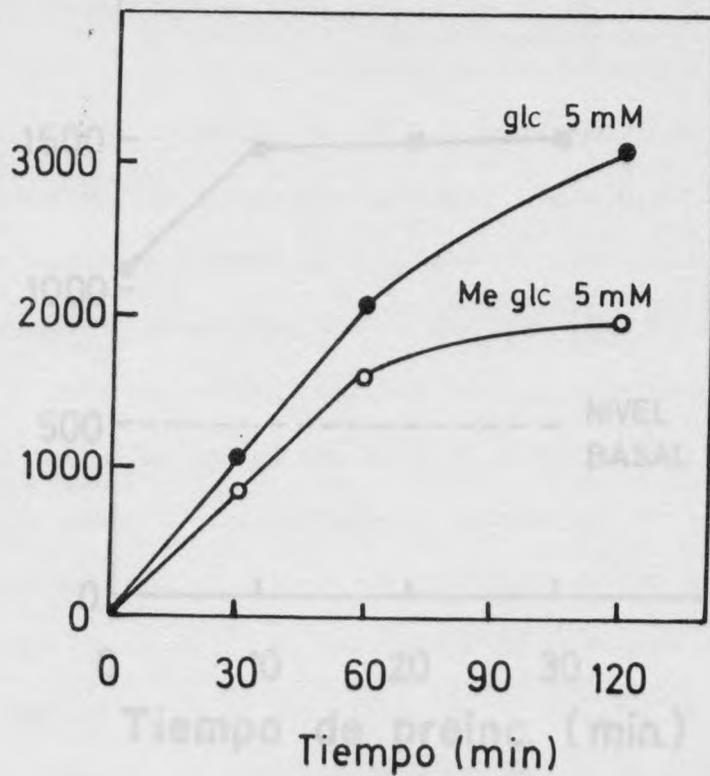


Figura 1:

Cinética de la entrada de glucosa al oocito

Se incubaron grupos de 5 oocitos de estado VI con $[^{14}\text{C}]$ - glucosa (●) o $[^{14}\text{C}]$ -3-0-metil glucosa (o) 5 mM durante 30, 60 y 120 minutos y se midió la entrada del azúcar como se indica en los Métodos.

Cada punto corresponde al promedio de tres ensayos y está expresado en pmoles por 5 oocitos.

ENTRADA DE GLUCOSA (pmoles/5 ooc)

Figura 2

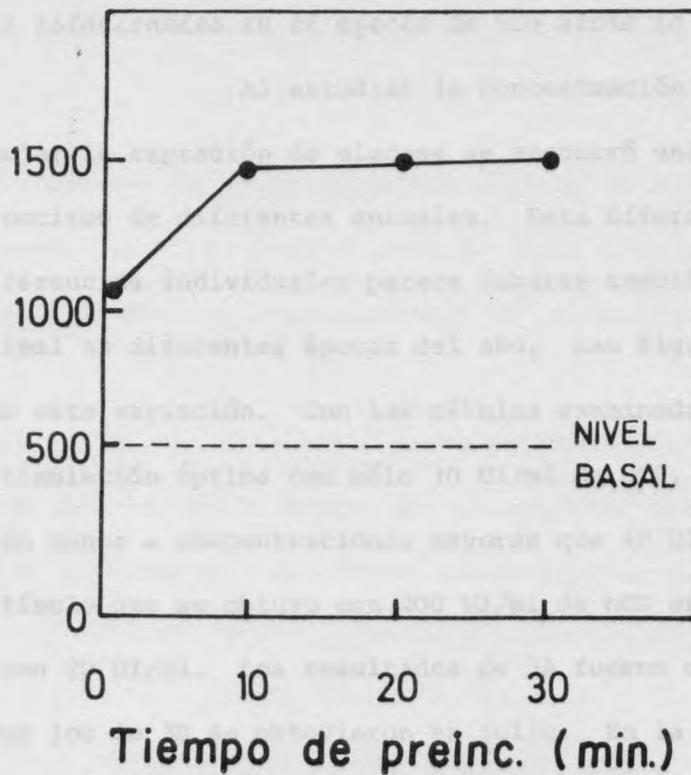


Figura 2:

Efecto de la preincubación con hCG en la entrada de glucosa

Se preincubaron grupos de 5 oocitos de estado VI con 100 UI/ml de hCG durante 0, 10, 20 y 30 minutos. Luego se agregó $[^{14}\text{C}]$ - glucosa 5 mM, durante 30 minutos y se midió su entrada al oocito como se indica en los Métodos. Cada punto corresponde al promedio de tres ensayos y está expresado en pmoles por 5 oocitos.

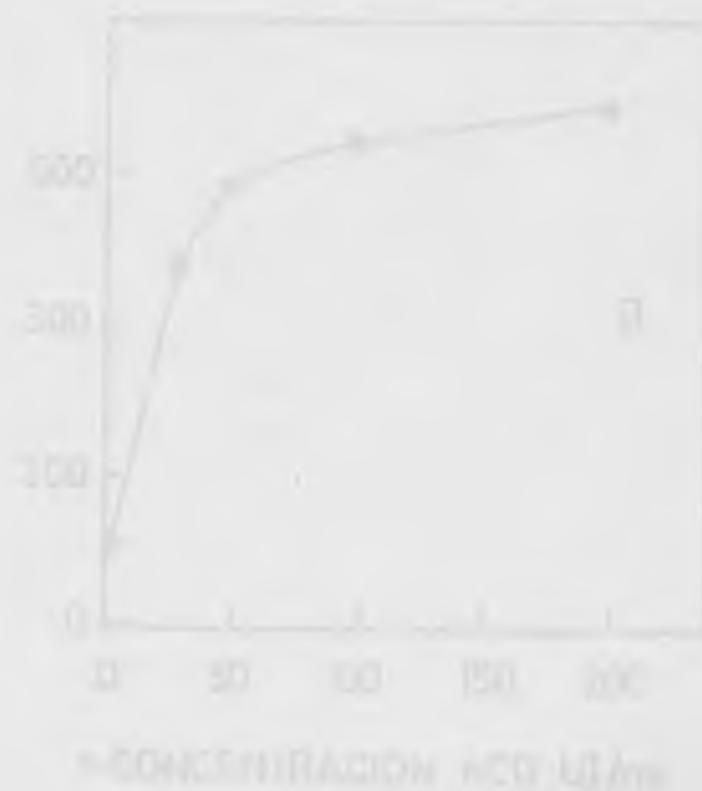
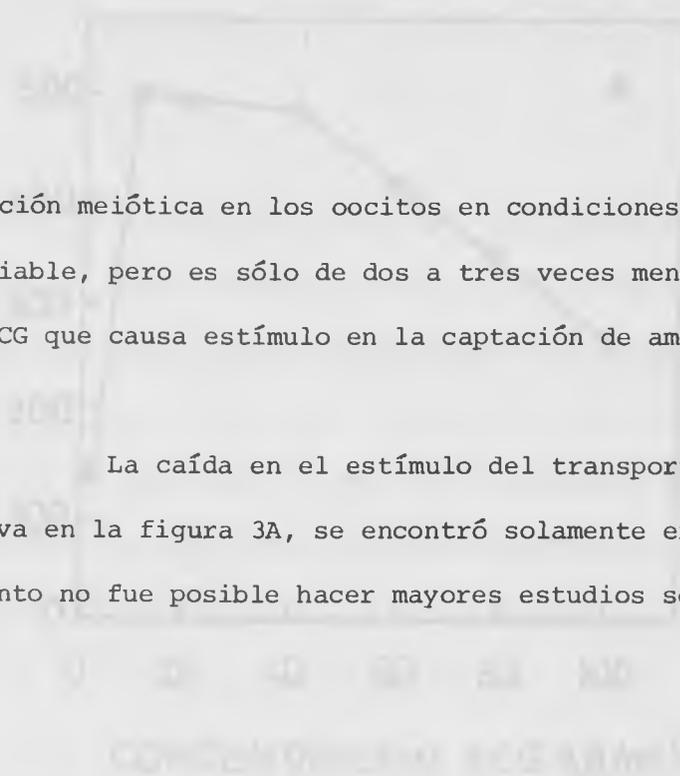
Variaciones estacionales en el efecto de hCG sobre la entrada de glucosa.

Al estudiar la concentración de hormona necesaria para estimular la captación de glucosa se encontró una notable variabilidad entre oocitos de diferentes animales. Esta diferencia, además de deberse a diferencias individuales parece deberse también al estado hormonal del animal en diferentes épocas del año. Las figuras 3A y 3B muestran ejemplos de esta variación. Con las células examinadas en 3A, se encontró una estimulación óptima con sólo 10 UI/ml de hCG, observándose una estimulación menor a concentraciones mayores que 40 UI/ml. En 3B, en cambio, el estímulo que se obtuvo con 200 UI/ml de hCG es mayor que el que se obtuvo con 20 UI/ml. Los resultados de 3A fueron obtenidos en mayo mientras que los de 3B se obtuvieron en julio. En la mayoría de los casos, sin embargo, el efecto óptimo se obtuvo con 100 UI/ml de hCG, como se muestra en la figura 3B. De todas maneras, antes de realizar cualquier experimento con oocitos de un ovario, se ensayó la concentración óptima de hCG requerida para obtener un estímulo máximo en la captación de azúcares por los oocitos, y se utilizó esta concentración hormonal para el ensayo.

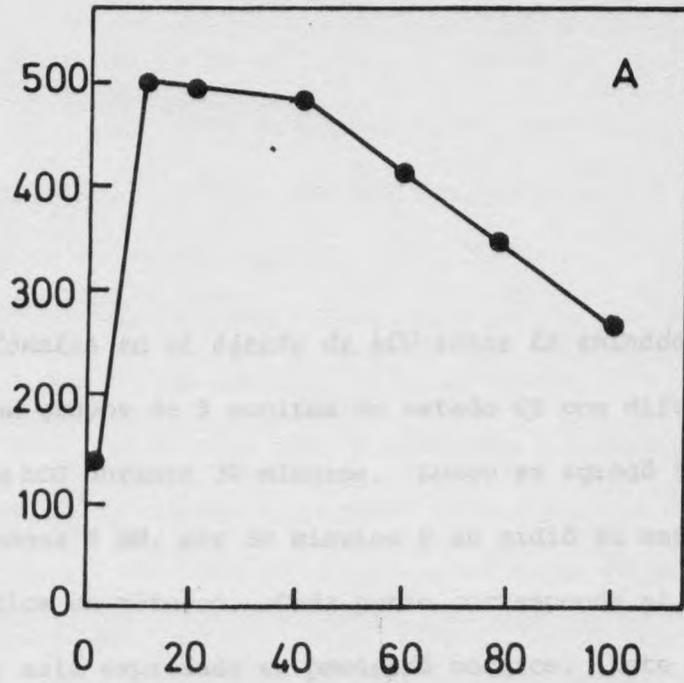
Es pertinente hacer notar que la concentración de hCG necesaria para causar ovulación en Xenopus laevis es de 1.000 UI/ml inyectadas por vía intramuscular. La concentración de hCG necesaria para

gatillar la maduración meiótica en los oocitos en condiciones in vitro también es muy variable, pero es sólo de dos a tres veces menos que la concentración de hCG que causa estímulo en la captación de aminoácidos (10).

La caída en el estímulo del transporte de glucosa, que se observa en la figura 3A, se encontró solamente en esa época del año, por lo tanto no fue posible hacer mayores estudios sobre este fenómeno.

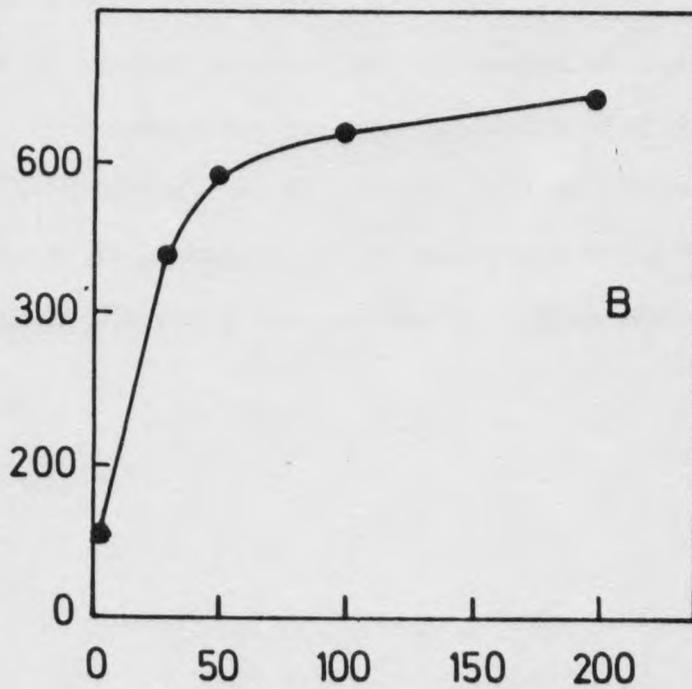


ENTRADA DE GLUCOSA (pmoles/5 ooc)



CONCENTRACION hCG (UI/ml)

ENTRADA DE GLUCOSA (pmoles/5 ooc)



CONCENTRACION hCG UI/ml

Figura 3

Variaciones estacionales en el efecto de hCG sobre la entrada de glucosa.

- A) Se preincubaron grupos de 5 oocitos de estado VI con diferentes concentraciones de hCG durante 30 minutos. Luego se agregó 5 μ l de $[^{14}\text{C}]$ - glucosa 5 mM, por 30 minutos y se midió su entrada al oocito como se indica en métodos. Cada punto corresponde al promedio de tres ensayos y está expresado en pmoles/5 oocitos. Este experimento fue realizado en el mes de mayo.
- B) Se realizó en la misma forma que el experimento 3A y corresponde al mes de julio.

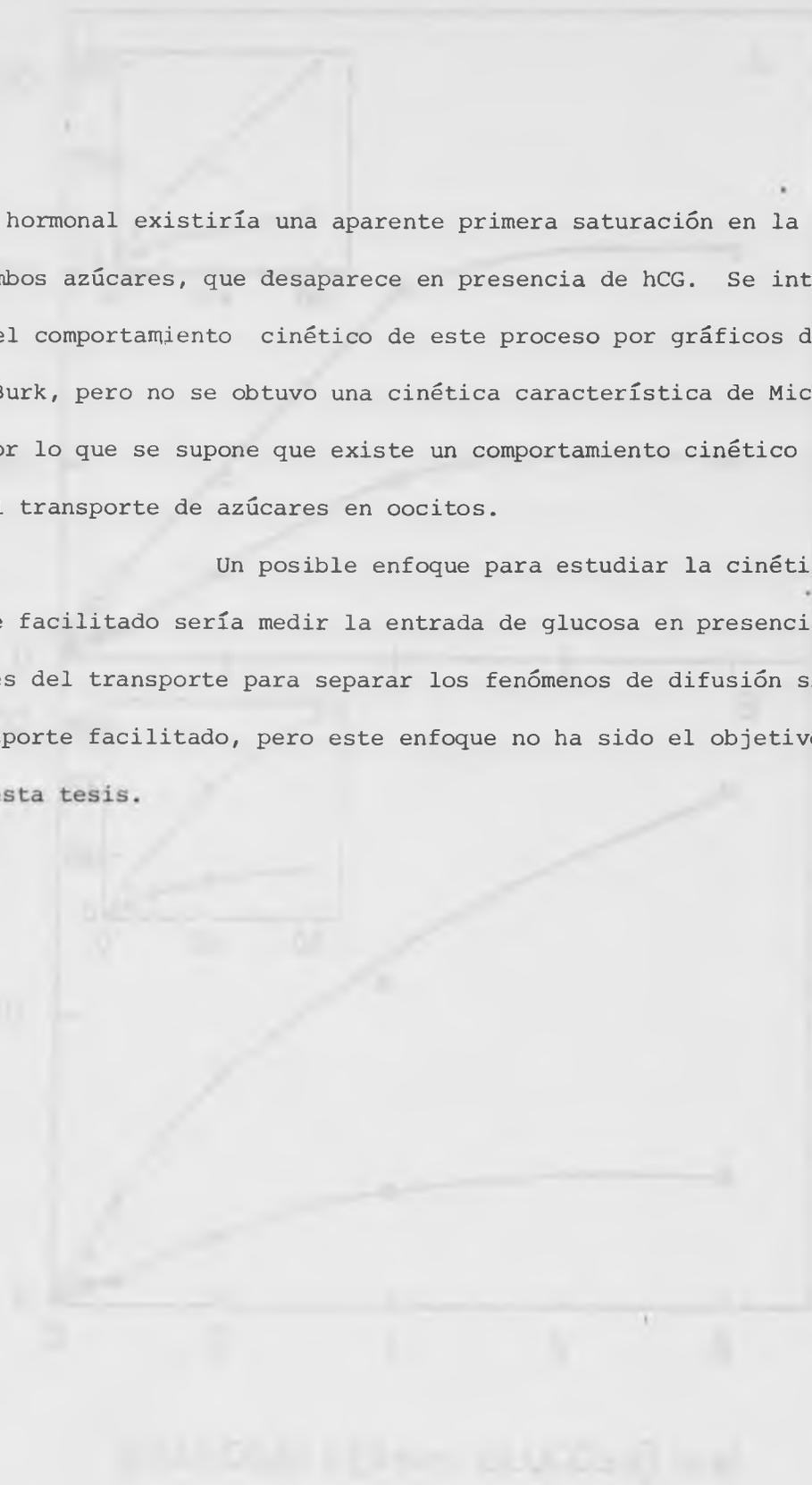
Efecto del hCG en la captación de glucosa y de 3-0-metil glucosa.

Se midió la captación de glucosa y de su análogo no metabolizable, 3-0-metil glucosa, en oocitos tratados con hCG, a diferentes concentraciones de ambos azúcares.

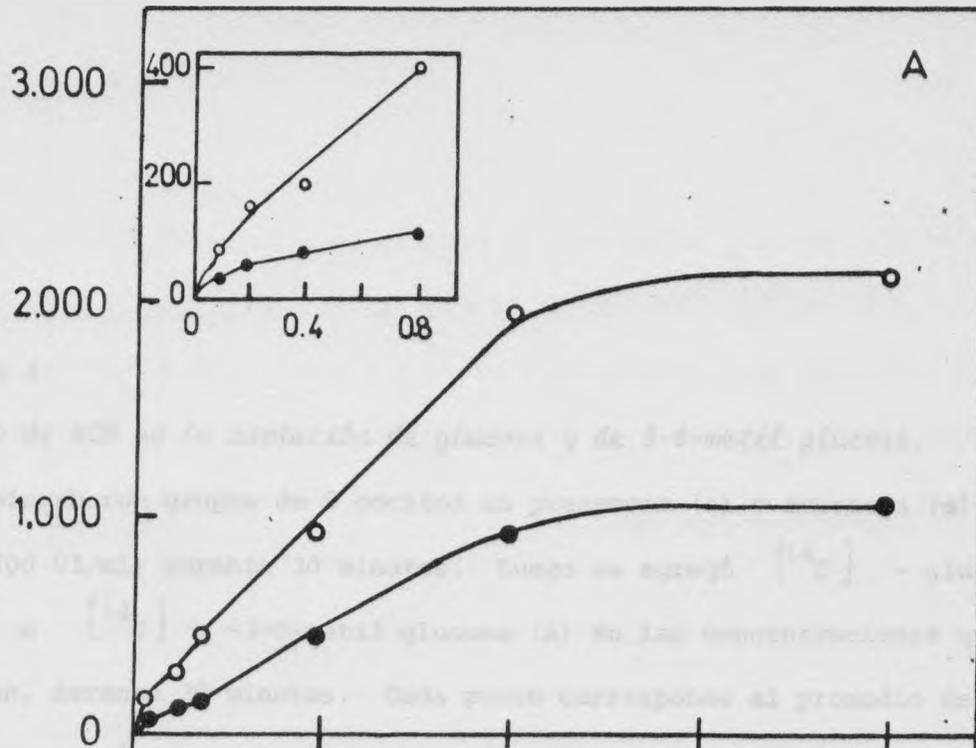
En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos que establecen que hCG estimula considerablemente la captación de 3-0-metil glucosa (A) y de glucosa (B), a todas las concentraciones de estos glúcidos estudiadas. Aparecen algunas diferencias en el comportamiento de estos azúcares, de las cuales la mas evidente se observa en las concentraciones mayores del azúcar. En el caso de 3-0-metil glucosa se observa una saturación del sistema cuando la concentración de glúcido es mayor de 4 mM, tanto en las células tratadas con hormona como en las células controles. Con glucosa, sin embargo, las células tratadas con hCG aumentan considerablemente su captación hasta una concentración de azúcar de 8 mM. También se debe destacar que los pmoles de glucosa captados por célula son aproximadamente el doble de la cantidad de 3-0-metil glucosa que entra a la célula. En el recuadro de las figuras A y B se muestra el detalle de la entrada de ambos azúcares a bajas concentraciones, es decir entre 0,2 y 0,8 mM. Se observa que en ausencia de tra

tamiento hormonal existiría una aparente primera saturación en la captación de ambos azúcares, que desaparece en presencia de hCG. Se intentó estudiar el comportamiento cinético de este proceso por gráficos de Lineweaver-Burk, pero no se obtuvo una cinética característica de Michaelis-Menten, por lo que se supone que existe un comportamiento cinético complejo para el transporte de azúcares en oocitos.

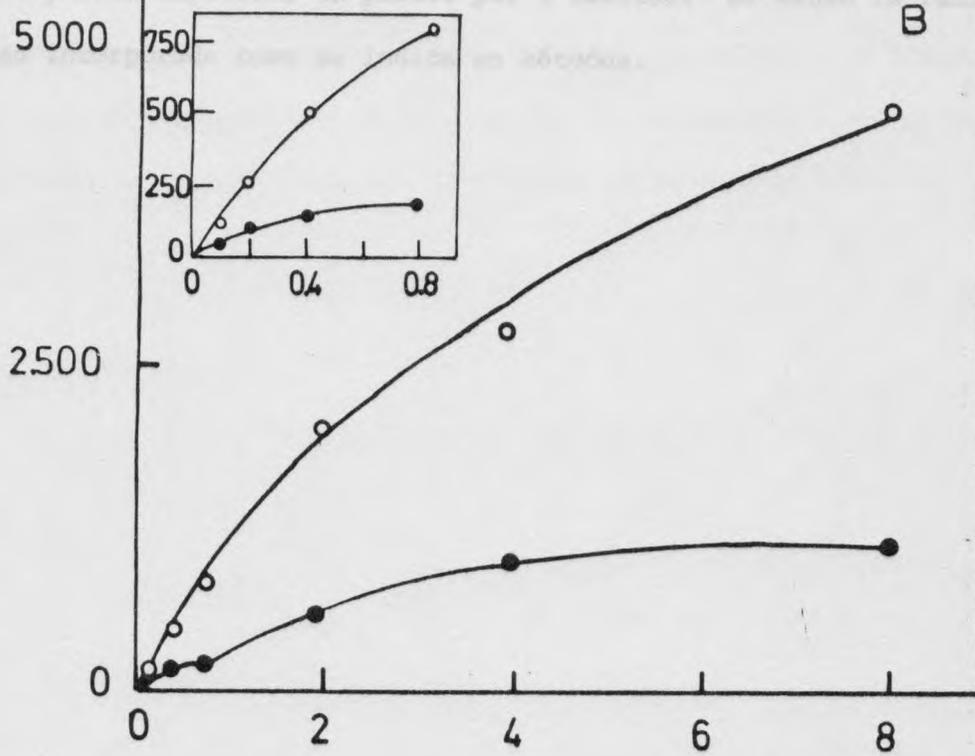
Un posible enfoque para estudiar la cinética del transporte facilitado sería medir la entrada de glucosa en presencia de inhibidores del transporte para separar los fenómenos de difusión simple y de transporte facilitado, pero este enfoque no ha sido el objetivo principal de esta tesis.



ENTRADA DE 3-o-m - GLUCOSA
(pmoles / 5 ooc)



ENTRADA DE GLUCOSA
(pmoles / 5 ooc)



[GLUCOSA] o [3-o-m GLUCOSA] mM

Figura 4

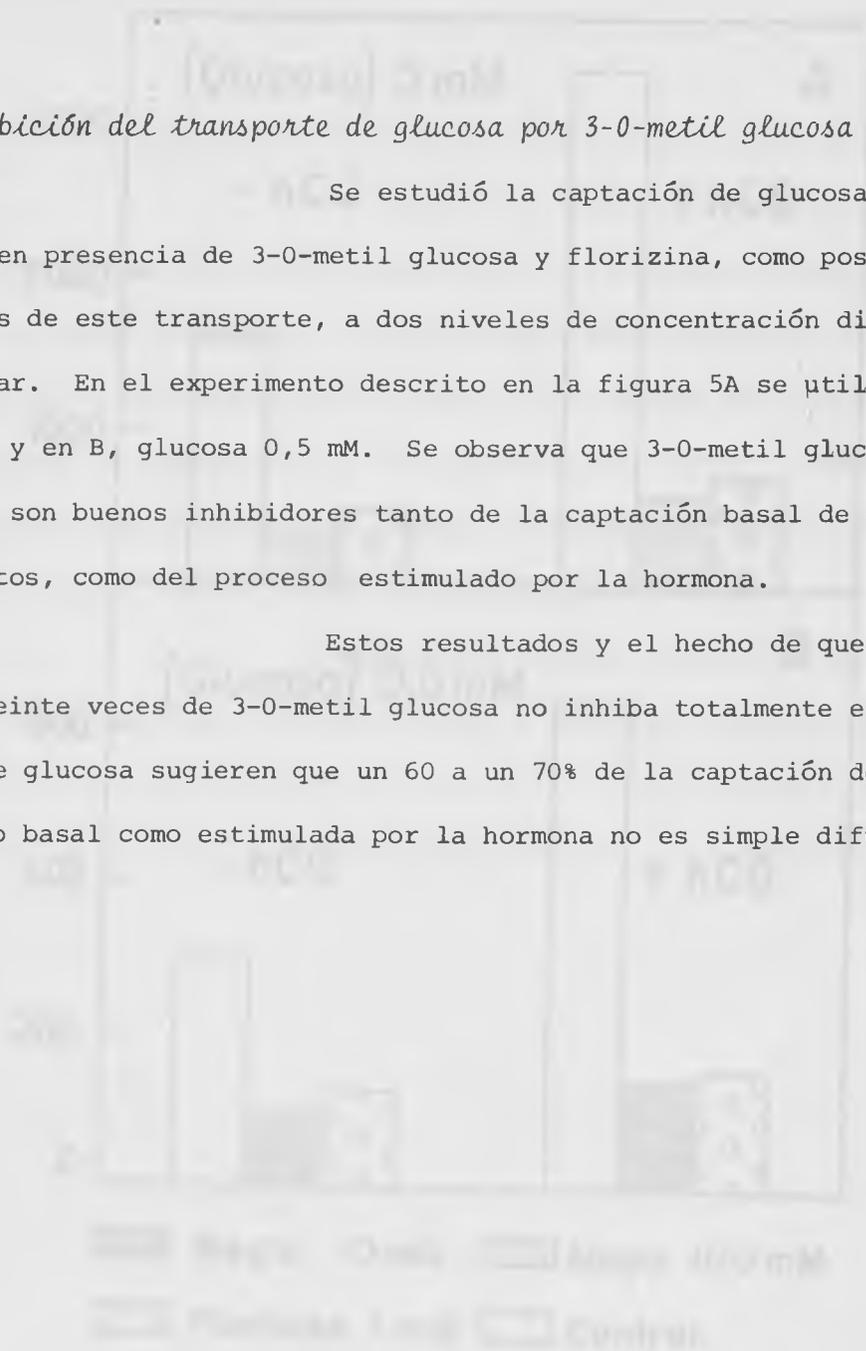
Efecto de hCG en la captación de glucosa y de 3-0-metil glucosa.

Se preincubaron grupos de 5 oocitos en presencia (o) o ausencia (●) de hCG (100 UI/ml) durante 30 minutos. Luego se agregó $[^{14}\text{C}]$ - glucosa (B) o $[^{14}\text{C}]$ -3-0-metil glucosa (A) en las concentraciones que se indican, durante 30 minutos. Cada punto corresponde al promedio de 3 ensayos y está expresado en pmoles por 5 oocitos. Se midió la radiactividad incorporada como se indica en Métodos.

Inhibición del transporte de glucosa por 3-0-metil glucosa y florizina

Se estudió la captación de glucosa por los oocitos en presencia de 3-0-metil glucosa y florizina, como posibles inhibidores de este transporte, a dos niveles de concentración diferentes del azúcar. En el experimento descrito en la figura 5A se utilizó glucosa 5 mM y en B, glucosa 0,5 mM. Se observa que 3-0-metil glucosa y florizina son buenos inhibidores tanto de la captación basal de glucosa en los oocitos, como del proceso estimulado por la hormona.

Estos resultados y el hecho de que un exceso de veinte veces de 3-0-metil glucosa no inhiba totalmente el transporte de glucosa sugieren que un 60 a un 70% de la captación de glucosa tanto basal como estimulada por la hormona no es simple difusión.



ENTRADA DE GLUCOSA (pmoles/5 ooc)

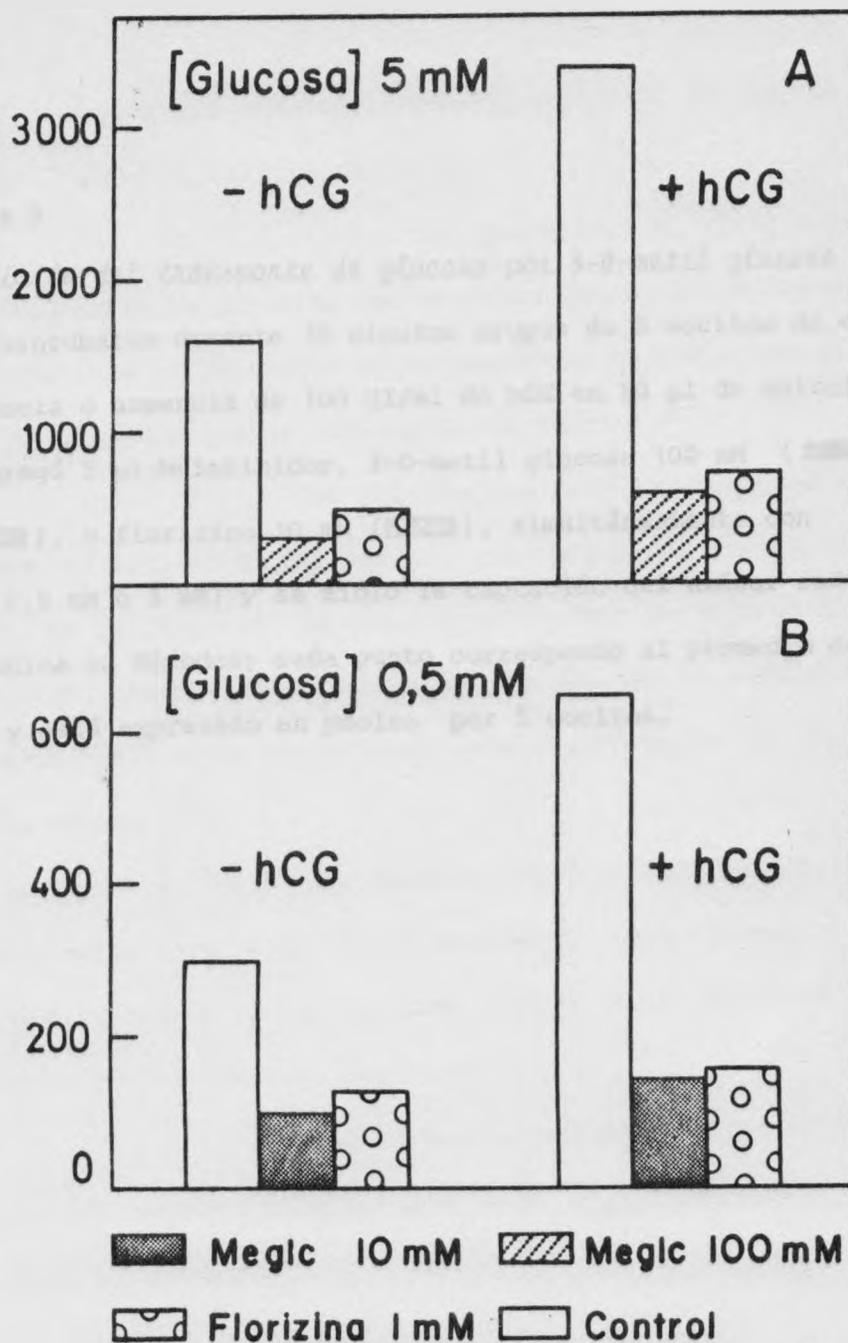


Figura 5

Inhibición del transporte de glucosa por 3-0-metil glucosa y florizina

Se preincubaron durante 30 minutos grupos de 5 oocitos de estado VI en presencia o ausencia de 100 UI/ml de hCG en 50 μ l de solución salina.

Se agregó 5 μ l de inhibidor, 3-0-metil glucosa 100 mM (■) ó 1 M (▨), o florizina 10 mM (▧), simultáneamente con $[^{14}\text{C}]$ -glucosa 0,5 mM ó 5 mM; y se midió la captación del azúcar radiactivo como se indica en Métodos; cada punto corresponde al promedio de tres ensayos, y está expresado en pmoles por 5 oocitos.

Efecto de diferentes hormonas sobre la captación de glucosa y la maduración de oocitos de Xenopus laevis.

Con el fin de conocer si otras hormonas gonadotrópicas aparte de hCG o de las hormonas que producen maduración en el oocito, tienen la capacidad de estimular la captación de glucosa, se hizo el experimento que se muestra en la tabla I.

Se observa que sólo las hormonas peptídicas que producen la maduración del oocito, como hCG y LH, tienen un efecto estimulante en la captación de glucosa en oocitos de estados IV, V, VI, de desarrollo. Este estímulo aumenta a medida que el oocito avanza en la oogénesis hasta alcanzar un valor máximo en oocitos de mayor tamaño (aquellos de estado VI).

La hormona FSH de origen bovino, estimulante del crecimiento del folículo en mamíferos, cuya estructura es en varios aspectos similar a LH (33), no tiene efecto en la captación de glucosa por los oocitos ni produce su maduración.

La progesterona, una hormona esteroideal que produce la maduración de los oocitos de X. laevis, no tiene efecto en la captación de glucosa.

Finalmente, la insulina cuyo efecto estimulante del transporte de glucosa en diversos tejidos ha sido ampliamente establecido (25, 26, 27 y 28), no afecta significativamente la captación de glucosa en oocitos a ninguna de las concentraciones estudiadas.

T A B L A I

EFECTO DE DIFERENTES HORMONAS SOBRE LA
CAPTACION DE GLUCOSA EN OOCITOS DE ESTADOS
DE CRECIMIENTO

Tratamiento	Estados de Desarrollo	% de Estimulo	% de Maduración
<u>Exp. 1</u>			
+ hCG(100 UI/ml)	IV	80	0
	V	100	0
	VI	150	100
+ LH(1 µg/ml)	IV	50	0
	V	70	0
	VI	100	100
+ FSH(1 µg/ml)	IV, V y VI	0	0
<u>Exp. 2</u>			
+ Progesterona (10 ⁻⁶ M)	VI	0	100
<u>Exp. 3</u>			
+ Insulina (0,07 nM-7 nM)	VI	0	-

Tabla I

Efecto de diferentes hormonas sobre la captación de glucosa y la maduración de los oocitos de Xenopus laevis.

Se preincubaron grupos de 5 oocitos en presencia o ausencia de la hormona indicada en 50 μ l de solución salina. Luego se agregó $[^{14}\text{C}]$ - glucosa para obtener una concentración final de 0,5 mM ó 5 mM, en el medio de incubación, y se midió la captación de glucosa después de 30 minutos tal como se indica en los Métodos. Los valores de captación de glucosa están expresados en porcentaje de estimulación con respecto a un valor control, sin hormona, ambos valores corresponden al promedio de tres ensayos. Para expresar la maduración de los oocitos se midió el porcentaje de oocitos que han sufrido ruptura de la vesícula germinal en un total de 50 oocitos. No se midió el efecto de insulina en la maduración de los oocitos (-).

Efecto de hCG en la captación de azúcares por oocitos de estados de desarrollo III, IV, V y VI.

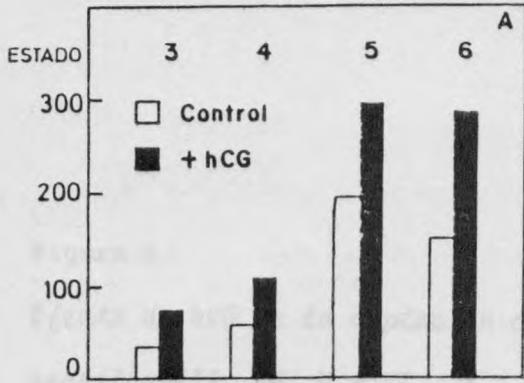
Como se dijo anteriormente, durante el proceso de oogénesis en el ovario de la rana Xenopus laevis se acumulan numerosos nutrientes que serán utilizados posteriormente durante el desarrollo embrionario. De tal forma es interesante estudiar la captación de glucosa en oocitos de diferentes estados de desarrollo y el efecto de hCG sobre este proceso.

En las figuras 6A y 6B se presentan los resultados obtenidos al medir la captación de glucosa y de 3-0-metil glucosa en oocitos de diferentes etapas de desarrollo y el efecto de hCG sobre este proceso. Al comparar ambos azúcares es evidente que la captación de 3-0-metil glucosa es sólo el 50% de la captación de glucosa en todos los efectos celulares. Se observa que la captación basal de los glúcidos aumenta con el tamaño de los oocitos hasta el estado V sufriendo una significativa disminución en el estado VI. Esta disminución se hace más notable en las figuras 6C y 6D en las que se expresan los mismos resultados que en 6A y 6B, pero en función de la superficie de la membrana de los oocitos.

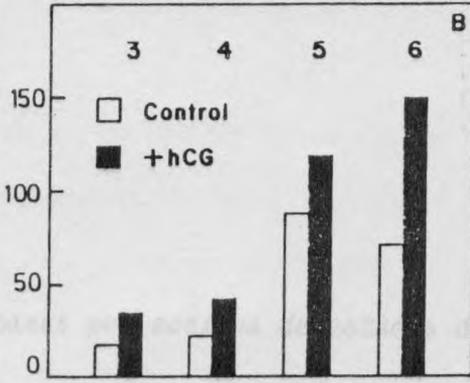
En la ordenada está expresada la captación de los azúcares en pmoles por 5 oocitos por mm^2 de superficie celular. En estas figuras se puede observar que hCG produce una estimulación muy significativa en la captación de ambos glúcidos en oocitos de todos los estados estudiados. En oocitos del estado V se observa un menor incremento porcentual de la captación de azúcares causado por hCG. Este fenómeno se debe posiblemente a que son éstos los oocitos con mayor actividad de captación basal. Como se mencionó al discutir la tabla I, es interesante que la hormona tenga efecto sobre la captación de nutrientes de oocitos de estados intermedios de la ovogénesis dado que la misma hormona es incapaz de gatillar la maduración meiótica en oocitos de estos estados.



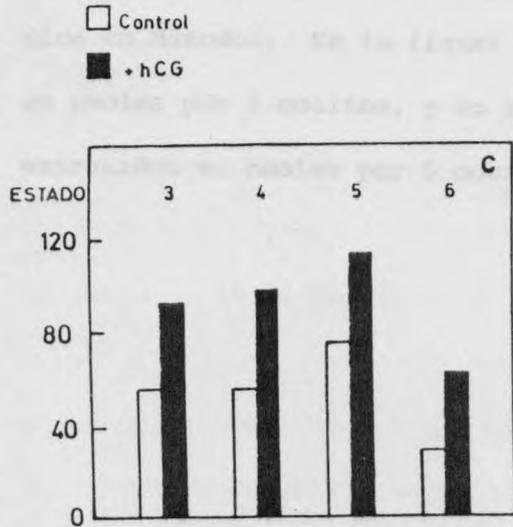
ENTRADA DE GLUCOSA (pmoles/5 ooc)



ENTRADA DE 3-0-m-GLUCOSA (pmoles/5 ooc)



ENTRADA DE GLUCOSA (pmoles/5 ooc/mm²)



ENTRADA DE 3-0-m-GLUCOSA (pmoles/5 ooc/mm²)

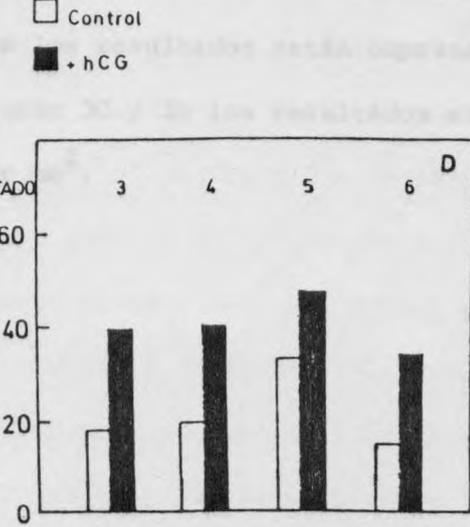


Figura 6

Efecto de hCG en la captación de azúcares por oocitos de estados de desarrollo III, IV, V y VI.

Se preincubaron grupos de 5 oocitos en presencia (●) o ausencia (○) de 100 UI/ml de hCG durante 30 minutos. Luego se agregó 5 μ l de [14 C] - glucosa o [14 C] -3-0-metil glucosa 5 mM durante 30 minutos y se midió la cantidad de azúcar radiactivo incorporado al oocito como se indica en Métodos. En la figura 3A y 3B los resultados están expresados en pmoles por 5 oocitos, y en las figuras 3C y 3D los resultados están expresados en pmoles por 5 oocitos por mm^2 .

Captación de glucosa y de 3-0-metil glucosa durante la maduración meiótica.

Se estudió la captación de glucosa y de 3-0-metil glucosa en oocitos de estado VI de desarrollo, 2, 4, 6 y 8 horas después de inducir la maduración meiótica con hCG o con progesterona.

En la figura 7A se observa que el estímulo inicial producido por la hCG en la captación de ambos azúcares decrece drásticamente seis horas después de haber tratado los oocitos con esta hormona llegando incluso a niveles bajo los basales a las ocho horas de tratamiento.

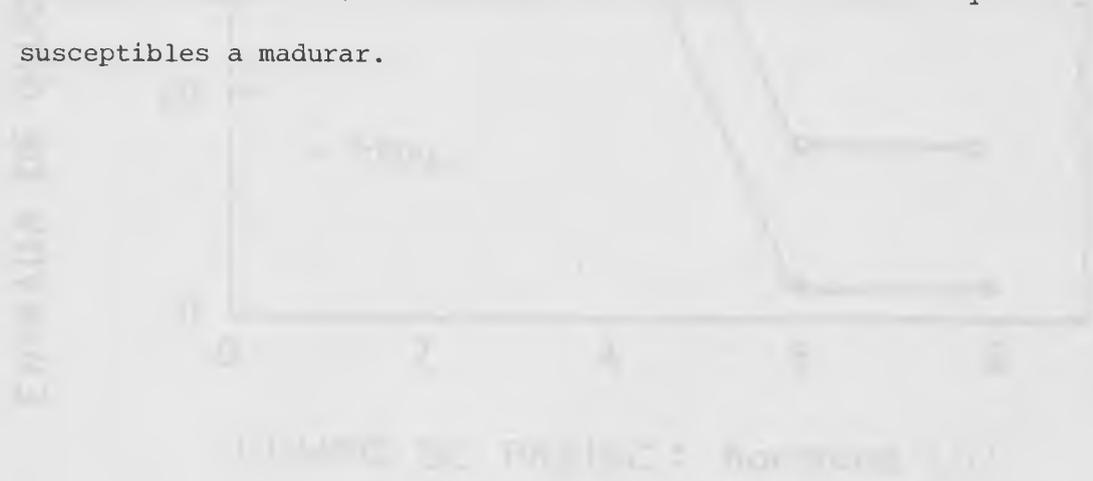
En la figura 7B se detallan los resultados obtenidos al medir la captación de los mismos azúcares en oocitos en proceso de maduración gatillada por progesterona. Como ya se había demostrado esta hormona difiere de hCG en que no causa el estímulo inicial en la entrada de los glúcidos pero en este caso también se observa la drástica disminución en la captación de estos nutrientes a las seis horas.

Al estudiar la ruptura de la vesícula germinal en estos mismos oocitos tratados con hCG y progesterona se pudo observar que precisamente ésta ocurre entre las cuatro y las seis horas de trata

miento hormonal (recuadro en la figura 7A) y por lo tanto coincide con el cierre en la membrana celular a la captación de azúcares.

Para verificar que la caída en la captación de azúcares era causado por el proceso de maduración y no simplemente un resultado de la prolongada preincubación de los oocitos con la hormona se repitió el experimento anterior haciendo una comparación en la captación de glucosa en oocitos de estados V y VI, tratados con hCG y con progesterona.

En la figura 8A se observa que los oocitos de estado V de desarrollo, que no sufren maduración en presencia de hCG, mantienen el estímulo en la captación de glucosa causado por hCG y no sufren la caída en la entrada del azúcar que se observa en los oocitos de estado VI que sí maduran. En 8B se observa que el tratamiento con progesterona produce una caída en la captación de glucosa sólo en los oocitos de estado VI, no afectando las células de estado V que no son susceptibles a madurar.



ENTRADA DE GLUCOSA (o) Y 3-o-m GLUCOSA (●) (pmoles/5 ooc.)

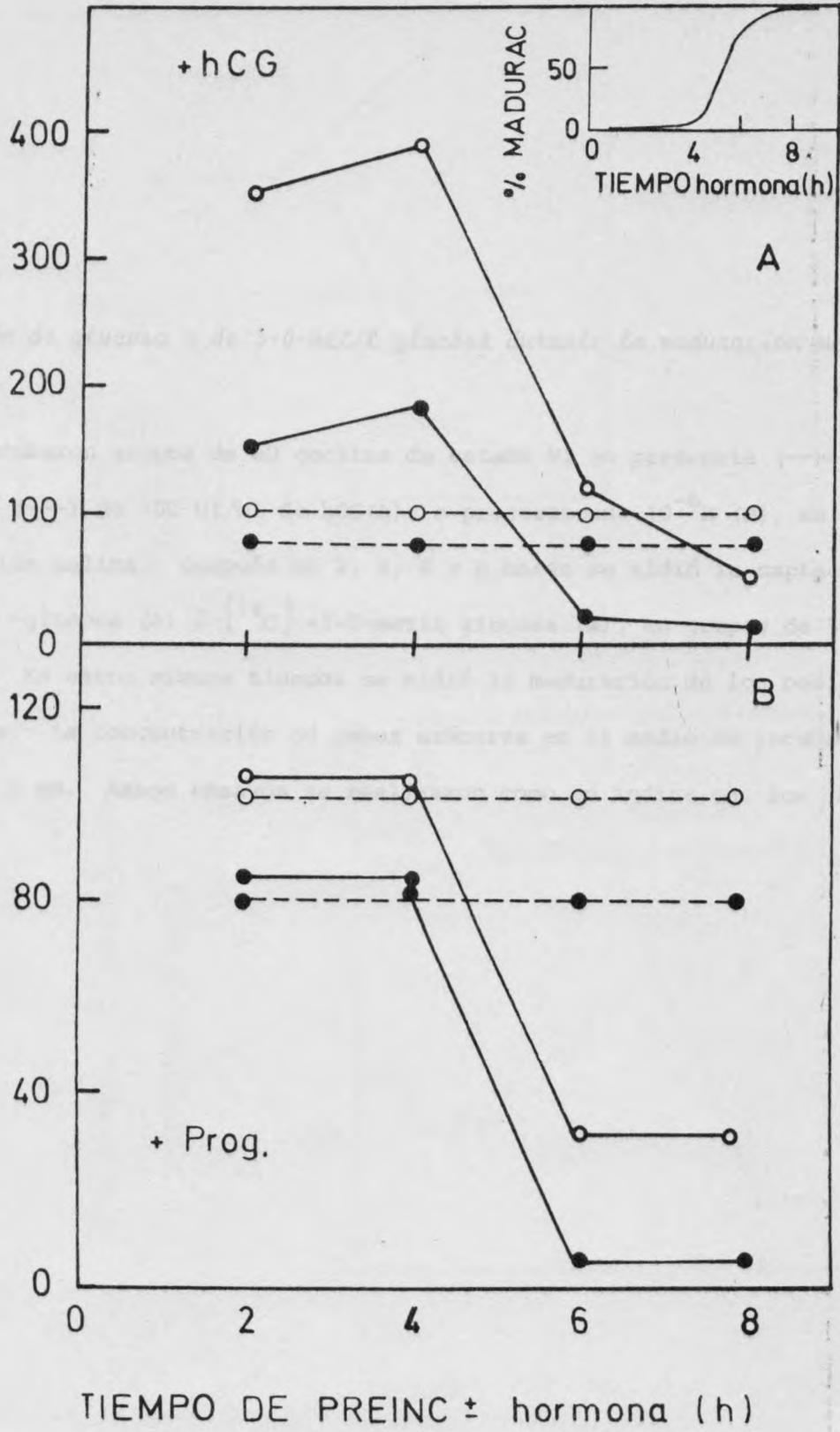
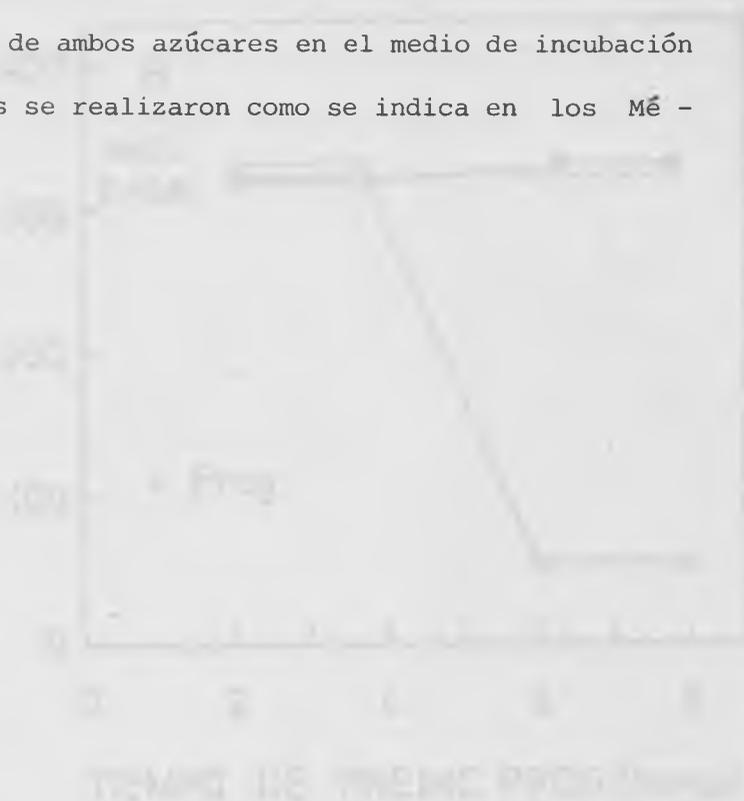


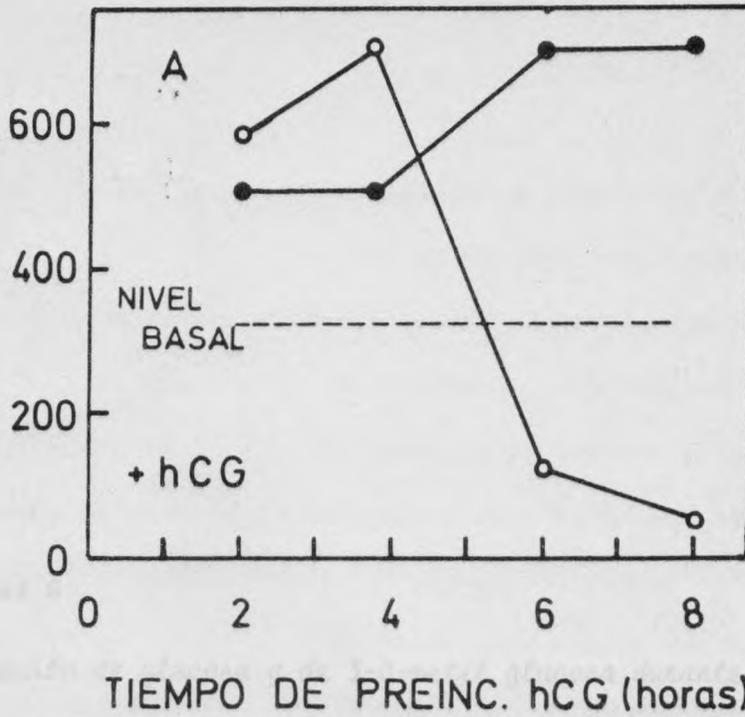
Figura 7

Captación de glucosa y de 3-0-metil glucosa durante la maduración meiótica.

Se preincubaron grupos de 60 cocitos de estado VI en presencia (—) o ausencia (---) de 100 UI/ml de hCG(A), o progesterona 10^{-6} M (B), en 3 ml de solución salina. Después de 2, 4, 6 y 8 horas se midió la captación de $[^{14}\text{C}]$ -glucosa (o) ó $[^{14}\text{C}]$ -3-0-metil glucosa (●), en grupos de 5 oocitos. En estos mismos tiempos se midió la maduración de los oocitos restantes. La concentración de ambos azúcares en el medio de incubación era de 0,5 mM. Ambos ensayos se realizaron como se indica en los Métodos.



ENTRADA DE GLUCOSA
(pmoles/5 ooc)



ENTRADA DE GLUCOSA
(pmoles/5 ooc)

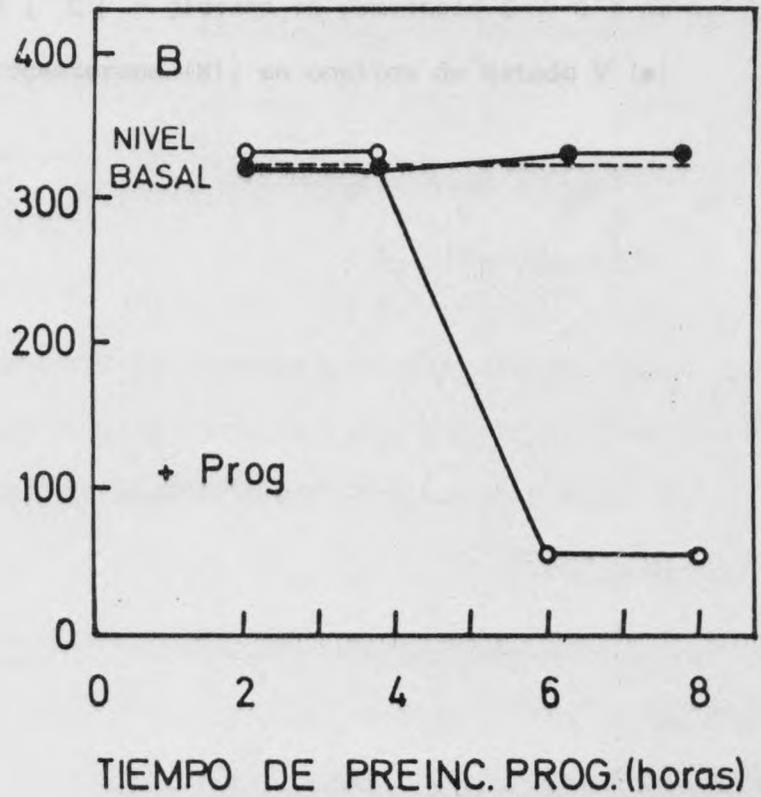


Figura 8

Captación de glucosa y de 3-0-metil glucosa durante la maduración meiótica.

Se realizó el ensayo en las mismas condiciones descritas en la figura 7.

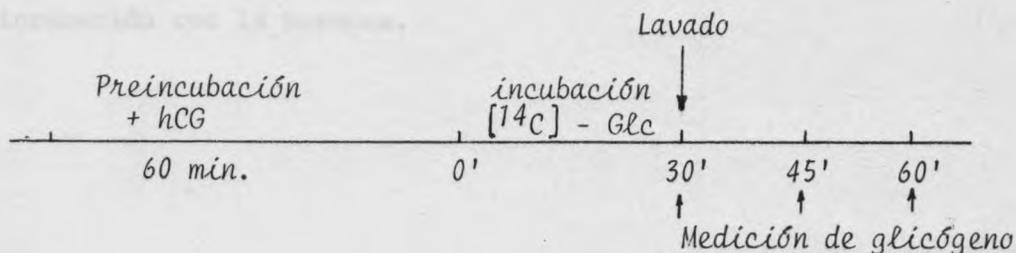
Se midió la incorporación de $[^{14}\text{C}]$ - glucosa en presencia (—) o ausencia (---) de hCG (A) o progesterona (B), en oocitos de estado V (●) y VI (○).

Efecto de hCG en la incorporación de glucosa a glicógeno.

Como un estudio complementario se midió el efecto de hCG sobre la incorporación de glucosa a glicógeno.

Para ello se preincubaron los oocitos con glucosa radiactiva durante 30 minutos, se lavaron y luego se midió la incorporación de glucosa a glicógeno a los 30, 45 y 60 minutos desde que se agregó la glucosa.

Se puede representar este experimento con el siguiente esquema:



Se observó que, aunque existe un estímulo de un 200% en la captación de glucosa, el porcentaje del azúcar incorporado a glicógeno a los 30, 45 y 60 minutos no varía mayormente entre

los oocitos tratados con hCG y los oocitos controles, como se observa en la tabla II.

Se realizó el mismo experimento anterior pero esta vez se inyectaron los oocitos con glucosa radiactiva y se midió su incorporación a glicógeno después de 30 y 60 minutos. Como se observa en la tabla III, tanto en oocitos preincubados con hCG como en oocitos controles el 95 al 100% de la glucosa inyectada al oocito fue incorporada a glicógeno.

De estos dos experimentos podemos decir que hCG no tiene efecto en la síntesis de glicógeno dos horas después de la preincubación con la hormona.

T A B L A II

EFECTO DE hCG EN LA INCORPORACION DE GLUCOSA A GLICOGENO EN OOCITOS

TRATAMIENTO	TIEMPO DE INCUBACION (min)	GLUCOSA INCORPORADA A GLICOGENO (pmoles/5 oocitos)	% GLUCOSA INCORPORADA A GLICOGENO
CONTROL	30	870	63
	45	1080	80
	60	1334	98
+ hCG (100 UI/ml)	30	3680	75
	45	4264	91
	60	4307	94

Tabla II

Efecto de hCG en la incorporación de glucosa a glicógeno.

Se preincubaron grupos de 5 oocitos de estado VI con 100 UI/ml de hCG durante 60 minutos. Luego se agregó $[^{14}\text{C}]$ - glucosa 5 mM y se midió la captación de glucosa radiactiva a los 30 minutos. A este tiempo, la cantidad de glucosa que entró al oocito fue de 1360 pmoles en ausencia de hCG y de 4590 pmoles en presencia de hCG; ambos resultados corresponden a cinco oocitos.

Se lavaron los oocitos y se midió la incorporación de glucosa a glicógeno a los 30, 45 y 60 minutos, tal como se indica en los Métodos. Cada resultado indica el promedio de tres ensayos y está expresado en pmoles por 5 oocitos.

T A B L A 111

EFFECTO DE hCG EN LA INCORPORACION DE GLUCOSA A GLICOGENO EN OOCITOS

TRATAMIENTO	TIEMPO DE INCUBACION (min.)	% DE GLUCOSA INYECTADA INCORPORADA A GLICOGENO
Control	30	96
	60	95
+ hCG (100 UI/ml)	30	94
	60	100

Se inyectaron grupos de 5 oocitos con [^{14}C]-glucosa, 1 mM, (4500 cpm por 5 oocitos), y se incubaron en presencia o ausencia de 100 UI/ml de hCG. Luego de 30 y 60 minutos se midió la incorporación de glucosa a glicógeno, como se indica en los Métodos.

DISCUSION

Los resultados presentados en esta tesis muestran claramente que los oocitos de Xenopus laevis poseen un sistema de transporte de glucosa estimulable por las hormonas gonadotrópicas hCG y LH, que producen la maduración de los oocitos. La hCG también produce un estímulo en la captación de 3-O-metil glucosa, el análogo de glucosa que no es metabolizado, lo que sugiere que el efecto de esta hormona en la entrada de glucosa al oocito es independiente de la fosforilación del azúcar. Podemos decir también que la entrada del azúcar al oocito está mediada por un sistema de transporte facilitado ya que la captación de glucosa es inhibida por 3-O-metil glucosa y por florizina, muestra una cinética de saturación y es dependiente de la temperatura. El transporte de glucosa estimulado por la hormona muestra estas mismas características.

Hay varias evidencias que dan fundamento a la idea de que el estímulo que produce la hCG en la captación de glucosa

está disociado del proceso de maduración propiamente tal. La primera evidencia está dada por el hecho de que la progesterona que es un potente inductor de la maduración no produce estímulo en la captación de glucosa. Más importante aún sería el resultado que nos indica que hCG podría estimular oocitos de tamaños intermedios (III al V) que no son capaces de madurar bajo la influencia de esta hormona. Además, estudios similares realizados sobre la captación de aminoácidos (10) muestran que ni la cicloheximida ni la teofilina, potentes inhibidores de la maduración, afectan el estímulo que produce la hCG sobre la captación de nutrientes.

A pesar de estos datos, no podemos descartar totalmente alguna relación que podrían tener las gonadotropinas en estos dos efectos sobre los oocitos. Es sugerente que sólo las dos hormonas gonadotrópicas que producen maduración, hCG y LH, son las que tienen efecto sobre el transporte de azúcares. Una hormona de estructura muy semejante, como la FSH, y otra de comprobado efecto estimulante sobre el transporte de glúcidos en otros sistemas, como la insulina

no tiene efecto sobre la maduración ni sobre la entrada de glucosa en oocitos. Se podría sugerir, basándose en esto que el efecto de hCG y LH sobre ambos procesos estaría mediado por los mismos receptores de la membrana específicos para estas hormonas. Una vez que el complejo hormona-receptor se hubiera formado los procesos podrían seguir caminos divergentes.

El segundo fenómeno descrito en este trabajo y que consiste en la drástica caída en la captación de glucosa varias horas después del tratamiento hormonal en oocitos crecidos (estado VI) presenta características muy diferentes. La evidencia indica que en este caso el efecto hormonal observado estaría ligado al proceso mismo de maduración. En primer término se ha establecido que ambas hormonas, hCG y progesterona, causan una disminución en la captación de nutrientes y que este efecto ocurre al mismo tiempo que la ruptura de la vesícula germinal. En segundo término se ha comprobado que los oocitos de estado V, que son capaces de responder al estímulo inicial sobre el transporte de glucosa causado por hCG y que no pueden madurar, no sufren la caída en la entrada de glucosa entre las seis y las ocho horas de tratamiento hormonal.

Tanto el estímulo producido por hCG inicialmente como la caída posterior en la captación de glucosa son efectos que no parecen estar mediados por el metabolismo de glucosa, sino al parecer el efecto se produciría en el mismo sistema transportador a nivel de membrana. El aumento de permeabilidad en las primeras horas de incubación con la hCG y la caída posterior son fenómenos que se han observado anteriormente en la captación de aminoácidos y vitelogenina (10 y 19). Estos dos eventos podrían estar relacionados con los cambios fisiológicos que ocurren en el oocito en el ovario de la rana. Como ya se dijo, cuando el oocito ha alcanzado el estado VI de desarrollo detiene su crecimiento hasta recibir un estímulo hormonal a través de la sangre, proveniente de la glándula pituitaria, que provoca la maduración y posteriormente la ovulación. Parecería conveniente que antes de ser liberado del ovario, el oocito captara gran cantidad de material alimenticio para su desarrollo posterior. Por lo tanto es posible que el aumento inicial producido por las hormonas gonadotrópicas, hCG y LH, en la captación de nutrientes tenga también un significado fisiológico en el animal completo.

Por otra parte al ocurrir la maduración y la ovulación el oocito es liberado del ovario al medio acuoso externo, del

cual no recibirá los nutrientes necesarios para su desarrollo, y que además puede tener compuestos dañinos para la célula. El cierre casi total de la membrana para el transporte de nutrientes al interior del oocito, al ocurrir la maduración, y el recubrimiento del huevo con una capa de gelatina, pueden ser por lo tanto necesidades fisiológicas para la sobrevivencia del futuro embrión.

Es de interés mencionar que estudios preliminares realizados en el laboratorio con el anfibio Gastrotheca riobambae, cuyos embriones son cultivados en una bolsa de la cual reciben nutrientes, demuestran que en estos oocitos no ocurriría el cierre de la membrana durante la maduración.

Al medir la síntesis de glicógeno en presencia o en ausencia de hCG, se encontró que la hormona no afecta el metabolismo de glucosa al menos en las dos primeras horas de incubación. Estos resultados nos corroboran el hecho de que la hormona afecta principalmente el sistema transportador de glucosa aumentando la entrada del azúcar al oocito. Sin embargo no sería posible con este método detectar una variación en otra vía metabólica del oocito dado que el porcentaje de glucosa que se incorpora a glicógeno es de alrededor de un 95%.

Para una mejor comprensión del mecanismo de acción de las hormonas gonadotrópicas sobre el transporte de glucosa y otros nutrientes, deben hacerse estudios cinéticos complementarios, con el fin de saber si la hormona afecta la afinidad del sistema de transporte o el número de transportadores en la membrana. Esto se puede conocer estudiando parámetros cinéticos como K_T y $V_{m\acute{a}x}$. en el sistema de transporte. Es importante también hacer un estudio más acabado del funcionamiento del sistema transportador, estudiando el número de moléculas que se unen a él.

Como ha sido establecido por varios autores, los iones como calcio y sodio juegan un rol importante en el transporte de glucosa y aminoácidos. En estudios electrofisiológicos realizados por Wallace se muestra que al separar el oocito del ovario su potencial de membrana sufre una hiperpolarización, este fenómeno no ocurre al inhibir el sistema transportador de sodio y de potasio por ouabaína (34). Por otro lado estudios realizados en el laboratorio muestran que al eliminar el potasio del medio de incubación se produce la maduración de los oocitos en ausencia de hormona (35). Todos estos resultados, que muestran una impor

tancia de los iones en la maduración de los oocitos, pueden tomarse como base para estudiar la implicancia de los iones en el transporte de nutrientes en oocitos de Xenopus laevis.

Sin duda, será también muy interesante para completar los estudios ya realizados, y comprender mejor los fenómenos de estímulo e inhibición en el transporte de nutrientes a través de la membrana celular conocer acerca de las proteínas y los lípidos que componen la membrana del oocito y de los posibles cambios que ocurrirían a este respecto durante la acción hormonal.

Finalmente, sería de gran interés estudiar el metabolismo de glucosa durante la maduración ya que este proceso involucra grandes cambios en la actividad celular.

REFERENCIAS

1. Introduction to Molecular Biology, Jean Brachet Eds. Spriger - Verlag, New York Inc. (1974).
2. Dumont, J.; J. Morphol. 136, 153-180, (1972).
3. Wallace, R.A.; Dumont, J.; J. Cell. Physiol. 72, 73-89, (1968).
4. Wallace, R.A.; Jared, D.; J. Exp. Zool. 175, 259-270, (1970).
5. Weinmann, R.; Roeder, R.; Proc. Natl. Acad. Sci. 71 1970-1974 (1974).
6. Masui, Y.; International Review of Cytology, 57, 186-274, (1979).
7. Smith, D.; Ecker, R.E.; Subtenly, S.; Dev. Biol. 17, 627-643, (1968).
8. Masui, Y.; J. Exp. Zool. 166, 365-376, (1967).
9. Schuetz, A.; J. Exp. Zool. 166, 347-354, (1967).
10. Otero, C.; Bravo, R.; Rodriguez, C.; Paz, B.; Allende, J.E.; Dev. Biol. 63, 213-223, (1978).

11. Hallberg, R.; Smith, D.; Dev. Biol. 48, 308-316,
(1976).
12. Masui, Y.; J. Exp. Zool. 177, 129-146, (1971)
13. Reynouht, H.; Smith, D.; Dev. Biol. 38, 394-400,
(1974).
14. Drury, K.C.; Schorderet-Slatkine, S.; Cell 4,
269-274, (1974).
15. Wasserman, W.J.; Masui, Y.; J. Exp. Zool. 193,
369-375, (1975).
16. Bravo, R.; Otero, C.; Allende, C.C.; Allende, J.E.;
Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 1242-1246, (1976).
17. Maller, J.L.; Krebs, E.G.; J. Biol. Chem. 252,
1712-1718, (1977).
18. Schorderet-Slatkine, S.; Schorderet, M.; Baulieu, E.;
Nature 262, 289- 290, (1976).
19. Schuetz, A.; Hollinger, T.; Wallace, R.; Sampson, D.;
Dev. Biol. 58, 428-433, (1977).
20. Brachet, J.; Dev. Biol. 51, 157-195, (1970).
21. Silverman, M.; Biochem. Biophys. Acta. 457, 303-351,
(1976).

22. Ullrich, K.J.; Ann. Rev. Physiol. 41, 181-195,
(1979).
23. Clausen, T.; Elbrink, J.; Biochem. Biophys. Acta
375, 292-308, (1975).
24. Barnes, D.; Colowick, S.; Proc. Natl. Acad. Sci. 74,
5593-5597, (1977)
25. Olefsky, J.; Biochem. J. 172, 137-145, (1978).
26. Cheung, J.; Conover, C.H.; Morgan, H.; Am. J. Physiol.
3, (1), E-70 - E-78, (1978).
27. Croford, O.; Renold, A.; J. Biol. Chem. 240, 3237-3243,
(1965).
28. Clausen, T.; Biochem. Biophys. Acta 183, 625-642,
(1969).
29. Nahara, H.T.; Ozand, P.; J. Biol. Chem. 238, 40-49,
(1963).
30. Warazala, L.; Cushman, S.; Salans, L.; J. Biol. Chem.
253, 8002-8005, (1978).
31. Vinten, J.; Glieman, K.; Osterling, K.; J. Biol.
Chem. 251, 794-800, (1976).
32. Gurdon, J.B.; In Methods of Developmental Biology,
eds. Wilt, F.H.; Wessels, N.K.; pp. 75-84, (1967).

33. Saxena, B.B.; Rathnam, P.; J. Biol. Chem. 251,
993-1005, (1976).
34. Wallace, R.A.; Steinhardt, R.A.; Dev. Biol. 57,
305-316, (1977).
35. Kofoid, F.; Knauber, D.; Allende, J.E.; Dev. Biol.
72, 374-380, (1979).

