

110
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

**PAPEL DEL FACTOR SEMEJANTE A INSULINA
(IGF-I) EN EL CONTROL DE LA PRODUCCIÓN DE
ESTEROIDES EN EL OVARIO DEL RATÓN B6Y.^{DOM}**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :
MIRIAM YESSENIA SALINAS VELÁZQUEZ

MÉXICO, D.F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

258103



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Presidente
Vocal
Secretario
Primer Suplente
2do Suplente

Prof. LOPEZ LOPEZ MARISOL
Prof. MIRANDA ANAYA MANUEL
Prof. VILLALPANDO FIERRO MARIA IRMA
Prof. ORTEGA MUÑOZ RAQUEL
Prof. PEDRAZA CHAVERRI JOSE

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de embriología molecular del departamento de biología celular bajo la dirección de la Dra. Ma. Irma Villalpando Fierro del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.



Asesor del tema
IRMA VILLALPANDO FIERRO



Sustentante
MIRIAM YESSENA SALINAS VELAZQUEZ

AGRADECIMIENTOS

A DGAPA-UNAM por la beca recibida para la elaboración de esta tesis a través del financiamiento económico del proyecto IN215296, otorgado a la Dra. Irma Villalpando Fierro.

A la Dra. Irma Villalpando Fierro del departamento de Biología Celular por sus enseñanzas, tiempo, dedicación y paciencia en la elaboración de este trabajo.

Al Biólogo Horacio Villafán Monroy del laboratorio del grupo de la Dra. Villalpando por su valiosa colaboración y enseñanza de la técnica de hibridación puntual.

A Floria Lizárraga Sánchez y David Roberto Pérez Vantine del grupo de la Dra. Villalpando por su valiosa colaboración en el procesamiento de las muestras con la técnica de hibridación puntual.

A Lilia Galván Miranda del grupo de la Dra. Villalpando por su valiosa colaboración y enseñanza de la técnica de microscopía electrónica.

A José Guadalupe Baltazar del laboratorio del Dr. Merchant-Larios del departamento de Biología Celular por su valiosa colaboración y enseñanza de la técnica de microscopía electrónica.

Al Dr. Marco José del departamento de Biomatemáticas por la enseñanza, asesoría y facilidades en la interpretación del análisis estadístico de esta investigación.

DEDICATORIAS

A Dios

Por toda la gente integra, positiva y maravillosa que ha estado junto a mí apoyandome incondicionalmente: mis padres Marina y Victor, mis hermanos Nancy y Cristhian, mi abuela Elena Abarca, mi tía Luz Maria y mis amigos, sobre todo mis muy apreciados Raffa, Tere, Edgar y la encantadora Gala.

Por todas las oportunidades que me han impulsado a crecer como persona entre las que sin duda destaca la de haberme formado en muchos aspectos en la Universidad Nacional Autónoma de México.

GLOSARIO

17 β -E2: 17 β -Estradiol
3 β -HSDH: 5 α -3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
ACTH: Hormona adenocorticotropica
AMPc: Adenosin monofosfato cíclico
CA: Cápsula de tejido conectivo
CGP: Células germinales primordiales
CSCC: 20, 22 desmolasa, del inglés: cleavage side chain cholesterol
dg.: días de gestación
DDSA: Anhídrido dodecimil succínico
DHEA: Dehidroepiandrosterona
DMP30: 2,4,6-tri (dimetilaminometil) fenol
dpp: Días *postpartum*
EGF: Factor de crecimiento epidermal
FGF: Factor de crecimiento fibroblástico
FP: folículos primordiales
FSH: Hormona estimulante del folículo
GH: Hormona de crecimiento
H*: Hormona marcada con un radioisótopo
H: Hormona
HDL: Lipoproteínas de alta densidad
HMG: Proteínas de alta movilidad
I¹²⁵: Radioisótopo de iodo 125
ICSH: Hormona estimulante de las células intersticiales en el testículo
IGF-I: Factor de crecimiento semejante a insulina tipo I
IGFBP: Proteínas específicas de unión para IGFs
LDL: Lipoproteínas de baja densidad
LH: Hormona luteinizante
NMA: Anhídrido metil nádico
OSO₄: tetraóxido de osmio
P4: Progesterona
PGE2: Prostaglandina E2
PKC: Proteína cinasa C
PL: Prolactina
RIA: Radioinmunoensayo
SDS: dodecilsulfato de sodio
SRY: Gene de la diferenciación testicular en humanos
Sry: Gene de la diferenciación a testículos en ratón
T: Testosterona
Tda-1: Gene recesivo de la cepa B6/J de la determinación del testículo-1
TDF: Gene de la diferenciación a testículos en humanos (considerado anteriormente)
Tdy^{DOM}: Gene de la diferenciación a testículos en *Mus musculus domesticus*
Tdy: Gene de la diferenciación a testículos en algunos vertebrados (considerado anteriormente)

TGF- β : Factor de crecimiento transformante

TSH: Hormona estimulante de la tiroides

UI: unidades internacionales

V: vaso sanguíneo

INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	
1.0 Organización morfológica del ovario	
a) Cresta genital	2
b) Gónada indiferenciada	2
c) Diferenciación testicular	3
d) Diferenciación ovárica	3
1.1 Hipótesis sobre la formación de folículos en el ovario	4
a) Origen mesonéfrico	4-5
b) Origen epitelial	5
c) Fragmentación de cordones sexuales	5
i) Ovocítica	5
ii) Epitelial	5
iii) Estromática	5-6
1.2 Diferenciación del tejido esteroideogénico	6-7
1.3 Crecimiento folicular	7-8
2.0 Características del ratón B6Y. ^{DOM}	
a) Aspectos genéticos	8-9
b) Desarrollo morfológico del ovario del ratón XY	9-10
c) Aspectos endocrinológicos	10
3.0 Función de las gonadotropinas en la foliculogénesis	
a) Organización anatómica y funcional de la hipófisis	11
i) Lóbulo anterior	11-12
ii) Lóbulo posterior	12
b) Función de las gonadotropinas	12-13
c) Receptores a FSH	13-14
4.0 Bioquímica de las hormonas esteroides	14-15
a) Clasificación bioquímica	15-16
b) Células esteroideogénicas del ovario	16

i) Estrógenos	16
ii) Andrógenos	16-17
iii) Progestinas	17
5.0 Control de la producción de esteroides	17-20
6.0 Función del factor semejante a insulina tipo I	
a) Factores de crecimiento	20-21
b) Características	21
c) Funciones	21-23
d) Proteínas de unión	23
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
IV. OBJETIVOS	25
V. MATERIALES Y METODOS	
1.0 Identificación del sexo genético de las hembras XY	26
a) Prehibridación	26
b) Hibridación	26
1.1 Cultivo organotípico por rotación	27
1.2 Determinación de progesterona	
a) Radioinmunoensayo	28
b) Preparación de soluciones para radioinmunoensayo	28
c) Procedimiento	28-29
2.0 Microscopía electrónica	
a) Fijación	29
b) Deshidratación	29-30
c) Preinclusión	30
d) Inclusión	30
d) Corte	30
VI. RESULTADOS	
1.0 Generalidades sobre la prueba ANOVA	31
2.0 Efecto del IGF-I en la producción de progesterona	
a) Cultivos con y sin FSH	31-32

b) Valores de P4 obtenidos con la variable edad	32
c) Valores de P4 observados con la variable sexo genético	32
3.0 Interacción de las variables	
a) Hormona-edad	33
b) Hormona-sexo genético	33
c) Edad-sexo genético	34
d) Interacción de todas las variables	34-35
4.0 Validación del análisis ANOVA	35
a) Análisis de covarianzas	35
b) Gráfica "Scatter" para la interacción de las variables	35
c) Gráfica de variabilidad	36
d) Correlación entre los promedios y las desviaciones estándar	36
e) Gráfica de residuos	36
f) Figuras	37-42
5.0 Descripción histológica de los ovarios B6.Y ^{DOM}	43-44
VII. DISCUSIÓN	45-50
VIII. CONCLUSIONES	51
IX. REFERENCIAS	52-65

I. RESUMEN

La producción de esteroides sexuales en el ovario de los mamíferos es controlada por diversos factores, entre éstos el factor semejante a insulina tipo I (IGF-I) el cual incrementa la síntesis de andrógenos como testosterona y androstendiona, además de progesterona (P4) en las células de la teca e intersticiales y en las células foliculares *in vitro* de diversas especies de mamíferos. Sin embargo, se desconoce cual es la función de este factor en la producción de P4 y andrógenos en el ovario del ratón. En la presente tesis, se estudió el papel del IGF-I y de la hormona estimulante del foliculo (FSH) en la producción de P4 en el ovario infantil del ratón B6Y.^{DOM} con la técnica de cultivo en rotación y radioinmunoensayo (RIA). Se observó que en el ovario XX y en el XY cultivados sin FSH hay una disminución en la producción de P4 de los 10 a los 11 dpp, la cual es mayor en el ovario XY. En el ovario XX se empiezan a incrementar los niveles de P4 a los 11 dpp, mientras que en el ovario XY este proceso se inicia a los 12 dpp. A los 12 dpp, los ovarios XX presentan una caída en la producción de P4 que se mantiene hasta el día 14 dpp, mientras que en los ovarios XY el descenso en la síntesis de P4 se observó en el día 13 dpp. La síntesis de P4 se empieza a incrementar el día 14 dpp en los dos tipos de ovarios. Asimismo, a los 10 dpp en los ovarios XX cultivados con FSH, los niveles de P4 aumentaron notablemente. En los ovarios XY a los 10 dpp la P4 secretada es la mitad de la detectada en el ovario XX y la producción de este metabolito se mantiene baja hasta los 12 dpp. La síntesis de P4 en los ovarios XX cultivados con FSH tuvo un importante incremento del día 12 al 14 mientras que la síntesis de P4 detectada en los ovarios XY a los 13 dpp fue 3 veces mayor.

Estos resultados sugieren que el IGF-I tiene un efecto dual estimulador-inhibidor, de la síntesis de P4 lo cual podría afectar la producción de este metabolito y de testosterona que se produce durante el desarrollo folicular temprano en el ovario del ratón B6Y.^{DOM}

II. INTRODUCCIÓN

1.0 Organización morfológica del ovario

a) Cresta genital

En mamíferos, la morfogénesis del ovario o testículo se lleva a cabo en tres etapas; la primera comprende la colonización de la cresta genital por las células germinales primordiales (CGP), que son las precursoras de los gametos y tienen un origen extragonadal. Estas se detectan entre los 7.5 y 8 días de gestación (dg.) en el extremo caudal del endodermo del saco vitelino y en la base del alantoides (Merchant-Larios, 1984). Las CGP tienen atracción específica por el epitelio gonadal y son translocadas por movimientos pasivos. A los 10 dg. las CGP migran activamente del intestino por el mesenterio dorsal hasta las crestas genitales (Merchant-Larios, 1984). Se ha propuesto que la atracción entre el epitelio celómico y las CGP se debe a la presencia de factores quimiotácticos cuya naturaleza hasta el presente no se ha demostrado.

b) Gónada indiferenciada

La segunda fase del desarrollo gonadal en los mamíferos corresponde a la etapa de gónada indiferenciada, la cual es común en hembras y machos. La gónada indiferenciada es un órgano bilateral localizado en la región ventral del mesonefros y está formada por tejido epitelial, mesenquimático y las CGPs (Brambell, 1972). La etapa de gónada indiferenciada corresponde a la proliferación de las células somáticas precursoras de las células foliculares y de las células intersticiales, las cuales originan los cordones sexuales y el tejido estromático que constituyen los precursores del ovario y del testículo (Merchant-Larios, 1976; Merchant-Larios, 1984).

c) Diferenciación testicular

La diferenciación de la gónada indiferenciada en testículos implica movimientos morfogenéticos y la diferenciación morfológica y funcional de los tipos de células que constituyen esta gónada (Merchant, 1984).

La diferenciación morfológica del testículo se inicia a los 12 dg. con la separación del epitelio celómico por invasión de mesénquima y vasos sanguíneos procedentes del mesonefros. Los cordones sexuales están formados por dos tipos celulares: las células de Sertoli y las CGP precursoras de los gametos (Merchant-Larios, 1984). Las primeras secretan la hormona que provoca la regresión de los conductos de Müller (Behringer y col., 1990; Magre y col., 1980; Shiraishi y col., 1993). Estas células forman un epitelio de tipo columnar y emiten prolongaciones citoplasmáticas que rodean a las CGPs. Las células que se encuentran alrededor de los cordones se diferencian para formar varios tipos celulares como células mioides, fibroblastos y de Leydig (Merchant-Larios, 1976). Estas últimas producen testosterona que induce el desarrollo de los conductos de Wolff y promueven la diferenciación de los genitales internos. La formación de los genitales externos requiere la transformación de la testosterona a 5α -dihidrotestosterona. Las células germinales en el testículo infantil reciben el nombre de espermatogonias (Lidner y col., 1974) y se mantienen en un periodo de reposo hasta la pubertad. Las CGP poseen puentes citoplasmáticos que se originan por una división llamada citogénesis incompleta los cuales desaparecen cuando las espermatogonias se diferencian en espermatozoides (Gondos, 1984).

d) Diferenciación ovárica

El ovario cambia poco comparado con la gónada indiferenciada, a los 12,5 dg. se observa que éste crece debido a la proliferación de células somáticas y germinales, aunque su diferenciación morfológica es posterior a la del testículo (Merchant-Larios, 1984). A los 15 dg. el ovario inicia la meiosis y las ovogonias presentan puentes

citoplásmicos que desaparecen con la formación de los folículos primarios y que son muy importantes en la sincronización de la foliculogénesis (Gondos, 1984).

1.1 Hipótesis sobre la formación de folículos en el ovario

La foliculogénesis es el proceso de formación de folículos, el cual se inicia en la etapa embrionaria y continua en la vida posnatal. El ovario consiste de un grupo de folículos en crecimiento con células de la teca y de la granulosa. Los folículos crecen a partir de una población de células germinales primordiales formadas durante el desarrollo fetal junto con grupos de células de la glándula intersticial. Las CGP sufren varias divisiones mitóticas que originan la formación de muchos millones de oogonias, algunas de las cuales sufren atresia, lo cual puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo en el ovario (Turner y Bagnara, 1971).

Durante la meiosis los ovocitos se observan en la fase de cigoteno y paquiteno, en esta última se observan los complejos sinaptonémicos formados por el acoplamiento de los cromosomas homólogos, durante estas etapas ocurre la degeneración de algunos ovocitos (Horbes, 1984). Se ha sugerido que el inicio de la meiosis está controlada por un factor que proviene del mesonefros o riñón embrionario, aunque se desconoce su naturaleza (Byskov, 1974). Las ovogonias sufren una reducción meiótica hacia el estado haploide y se rodean por una capa de células de la granulosa, esta estructura es el folículo primordial que se mantiene en la profase I de la primera división meiótica en la fase de diploteno (Ivell y col., 1992). Es hasta la pubertad, por acción de la hormona luteinizante (LH) que este proceso se reanuda (Austin y Short, 1984), se elimina el primer lóbulo polar y sólo se completa la meiosis si hay fertilización. Si el ovocito secundario no es fertilizado se mantiene vivo de 1-72 horas y después degenera (Pehleman y Lombard, 1978). Existen tres hipótesis que tratan de explicar la foliculogénesis:

a) Origen mesonéfrico

En la primera hipótesis se propone que las células de la región del *rete ovarii* (asociación continua de los cordones sexuales ováricos con los túbulos mesonéfricos

que penetran al ovario (Byskov, 1973), contribuyen a la formación de los folículos primordiales, sin embargo, la migración de células mesonéfricas que ya están diferenciadas desde una localización extragonadal para cubrir las asociaciones ovocíticas-epiteliales es poco probable (Merchant-Larios, 1984).

b) Origen epitelial

La segunda hipótesis plantea que las células foliculares se originan del epitelio celómico que bordea la gónada. Los ovocitos se encuentran rodeados por células epiteliales organizados como un epitelio cúbico y están separadas por la lámina basal que separa el epitelio del estroma o tejido conectivo gonadal. Las células epiteliales más alejadas están organizadas en capas que separan a las CGP que proliferan en la región subcortical. Las células germinales desnudas ya no se encuentran en el estroma y están embebidas en el epitelio celómico para después convertirse en folículos. Además, el epitelio celómico que se une al epitelio superficial vía lámina basal está en proliferación activa (Merchant-Larios, 1984).

c) Fragmentación de cordones sexuales

La tercera hipótesis propone que la formación de folículos surge de la fragmentación de los cordones sexuales o cordones epiteliales ováricos (Merchant-Larios y Chimal-Monroy, 1989). Estos autores dividieron a la foliculogénesis en tres etapas:

i) Ovocítica: Los ovocitos o gametos femeninos están agrupados en contacto directo en el interior de los cordones sexuales.

ii) Epitelial: Los ovocitos son separados dentro de los cordones sexuales por las células epiteliales precursoras de las células de la granulosa.

iii) Estrómatica: Los ovocitos junto con las células epiteliales unidas a ellos, rodeados por una lámina basal son separadas por las células del estroma

(mesenquimáticas). Estas células provienen de la región vecina al mesonefros pero no de este órgano y a partir de éstas se diferencian las células de la teca.

1.2 Diferenciación del tejido esteroideogénico

La presencia de las células germinales no es necesaria para el establecimiento de la gónada diferenciada, ni para la diferenciación sexual. Sin embargo, la ausencia de ovocitos en el ovario durante la etapa inicial de la foliculogénesis impide la citodiferenciación del tejido esteroideogénico (Merchant-Larios y Coello, 1979). Cuando algunos ovocitos están presentes al inicio de la foliculogénesis, los folículos se desarrollan normalmente pero sufren atresia durante toda la vida reproductiva y en la infancia, estos dejan masas de tejido esteroideogénico intersticial. El proceso de atresia de la primera generación de folículos probablemente es parte del programa de desarrollo del ovario que conlleva al establecimiento de la glándula intersticial (Guraya, 1973; Merchant, 1979; Merchant y Centeno, 1981). En el ovario algunas células de la teca que rodean al epitelio folicular se hipertrofian y forman acúmulos celulares en el estroma, dando origen a la glándula intersticial. Se ha planteado que esta glándula se forma en el momento en que los ovocitos mueren y las células de la teca se hipertrofian y producen fundamentalmente andrógenos. (Turner y Bagnara, 1971). Durante el desarrollo de los folículos primordiales se requiere de la diferenciación de varios tipos celulares, como las células mesenquimáticas tipo fibroblasto, que dan origen a las células intersticiales o de la teca; la primera en diferenciarse es la teca interna y posteriormente se desarrolla la teca externa. (Turner y Bagnara, 1971; Guraya, 1973). Durante la vida reproductiva de un mamífero un grupo de folículos primarios empiezan a desarrollarse al final de cada ciclo menstrual resultando en un incremento en el tamaño del ovocito y un cambio en la forma en la capa de células de la granulosa. Para una mayor maduración de los folículos primarios se requiere de la hormona foliculo estimulante (FSH) y después de la hormona luteinizante (LH) para formar el folículo preovulatorio (Graaf) que empieza a secretar andrógenos (androstendiona y testosterona) y estrógenos (estradiol -13 β). Bajo la acción de la LH se

completa la primera división meiótica, el ovocito primario inicia la segunda división meiótica hasta el estado de metafase I (Horbes, 1942).

1.3 Crecimiento folicular

Una vez que se han formado los folículos estos pasan por una fase de crecimiento durante el periodo infantil que en roedores comprende del día 1 *postpartum* (dpp) hasta el día 30 dpp (Byskov, 1973; Ireland y col., 1987, Ireland y Richards, 1978). Puesto que se sabe que el eje hipotálamo-hipófisis se establece en roedores hasta los 35 dpp (Byskov, 1973). Por otra parte, Goodman y Hudgen (1983) describen tres eventos asociados a la foliculogénesis después que se ha establecido el eje hipotálamo-hipófisis en roedores.

1. Reclutamiento: Un evento dependiente de gonadotropinas durante el cual un grupo de folículos adquiere la habilidad para responder a las gonadotropinas y requieren de éstas para mantener un crecimiento continuo.

2. Selección: Un proceso en que los folículos reclutados son seleccionados para escapar a la atresia y sobrevivir a la ovulación; el proceso a través del cual ocurre el reclutamiento se desconoce.

3. Dominancia: Mecanismo que un folículo dominante u ovulatorio utiliza para escapar de la atresia.

Los folículos en maduración se mantienen en la superficie del ovario, acompañados por proliferación de células de la granulosa que tienen al oocito a un lado del folículo con la formación de un espacio lleno de fluidos (*el antrum*). La división meiótica ocurre se elimina el primer cuerpo polar con un juego cromosómico y se obtiene el ovocito secundario que es haploide y contiene la mayor parte del citoplasma. Justo antes de la ovulación, el folículo se observa como un protuberancia en la superficie del ovario (Ishwar y Sankaranarayanan, 1987; Amsterdam y col., 1975). La ovulación ocurre bajo la influencia de la LH y se acompaña por una ruptura del folículo con la liberación del ovocito con el fluido antral y la transportación hacia la trompa de falopio. El folículo en ruptura se colapsa y las células de la teca y de granulosa que quedan se transforman en

células leutinizadas que forman el cuerpo lúteo y empiezan a secretar progesterona la cual es esencial para el mantenimiento del embarazo (Quatropani, 1973).

2.0 Características del ratón B6.Y^{DOM}

a) Aspectos genéticos

En los mamíferos la presencia o ausencia del cromosoma Y determina la diferenciación de las gónadas en testículos y ovarios, respectivamente. El factor responsable de la diferenciación a testículos conocido como *TDF* en humanos y *Tdy* (su homólogo en otros vertebrados) se identificó como el gen *SRY* en humanos y *Sry* en el ratón (Gubbay y col., 1990; Koopman y col., 1991; Sinclair y col., 1990). La homología de nucleótidos del *Sry* y la secuencia de aminoácidos de éste con la familia de proteínas de alta movilidad (HMG), sugieren que el *Sry* es un factor de transcripción que inicia una cascada regulatoria de eventos genéticos que conllevan a la organización testicular (Gubbay y col., 1990; Sinclair y col., 1990; Berta y col., 1990). La presencia del *Sry* hace que el testículo embrionario de los mamíferos produzca testosterona y la hormona inhibidora de los conductos Müllermanos los cuales regulan el desarrollo de genitales externos e internos, así como las características sexuales secundarias (Donahoe, 1982).

De estudios previos se sabe que cuando un macho de una población de *Mus musculus domesticus* se cruza con una hembra C57BL/6J (B6), toda la descendencia de la primera generación, F1, son normales. La retrocruza de machos de la cepa F1 con las hembras B6 origina que la mitad de fetos XY se desarrollen como hembras con ovarios bilaterales y la otra mitad como ovotestis (poseen componentes ováricos y testiculares), sin embargo en la misma camada se diferencian hembras con ovarios normales en la vida embrionaria (Nagamine y col., 1987). Una de las explicaciones a la presencia de las hembras XY es que el gene que determina la diferenciación de los testículos en *Mus musculus domesticus* (*Tdy*^{DOM}) interactúa incorrectamente con un gene recesivo de la cepa B6/J para la determinación del testículo-1 (*Tda-1*) (Eicher y col., 1983; Lee y Takedo, 1994;

Eicher y Washburn, 1986 y 1983). La presencia de hembras genéticas XY sugiere que el cromosoma Y necesita interactuar con otros genes en los autosomas (*Tda-1*) o en el cromosoma X para inducir de la diferenciación testicular completa. Asimismo, los autosomas juegan un papel importante en la diferenciación sexual. Se ha propuesto que algunos autosomas como el gene asociado a la reversión sexual (*Tas*) y el complejo *T/t* del cromosoma 17 de *Mus musculus* tienen un papel importante en la diferenciación sexual al interactuar con el producto del gene *Sry* a través de un mecanismo desconocido (Eicher y Washburn, 1983 y 1986; Eicher y col., 1980).

Por otra parte, Eicher y Washburn, 1986, propusieron que, el alelo *Tdy* de Y^{DOM} inicia el patrón de diferenciación a testículos después de que el *Tdy* lo hace en la cepa B6. La diferenciación del testículo que es regulada en la cepa B6 por alelos autosómicos se inicia más tempranamente. Aunque la hembra sexualmente revertida $B6.Y^{DOM}$, parece fenotípicamente normal, tiene un ciclo estral irregular y no puede llevar a término la preñez (Taketo y col., 1991) y además la mayoría de los ovocitos mueren en fases muy tempranas (Merchant y col., 1984).

En contraste, el ratón hembra mutante XY que tiene delección en la región *Sry* del cromosoma Y es fértil. Estas diferencias en fertilidad entre la mutante XY y $B6.Y^{DOM}$ sugieren que la expresión del gene *Sry* en cierto momento durante el desarrollo podría interrumpir el establecimiento de las funciones normales del ovario en el ratón $B6.Y^{DOM}$ (Chung- Hae y Taketo, 1994).

b) Desarrollo morfológico del ovario del ratón XY

La diferenciación testicular en los embriones macho empieza a los 12 dg. en el ratón (Byskov, 1981; Taketo y col., 1991). El desarrollo del ovario XX y XY es similar en las etapas iniciales de formación de la gónada. Sin embargo, a los 16 dg. los ovarios XY empiezan a perder las células progenitoras de la granulosa (CGP) de la región medular, dejando en esta zona cordones sexuales constituidos en su interior únicamente por células epiteliales (precursoras de la granulosa y células de la teca) en el intersticio; los ovocitos que permanecen en la corteza forman folículos (Taketo y col., 1991). Aunque éstos

continúan muriendo de manera que las hembras XY tienen el ovario completamente depletado de ovocitos a las 9 semanas del nacimiento (Villalpando y col., datos sin publicar). El desarrollo del ovario XY es morfológicamente comparable al ovario XX hasta el día 16 de gestación (dg.), momento en el cual la mayoría de las células germinales ya han llegado al zigoteno o paquiteno de la profase meiótica. Sin embargo, en el día del parto (19 o 20 dg.), ningún oocito permaneció en los cordones medulares del ovario XY. En el control (ovario XX) la primera generación de folículos se desarrolló en la región medular y la actividad de la 5α - 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSDH) se detectó en las primeras células estrómatas alrededor de los folículos en crecimiento a los 10 dpp (Taketo y cols., 1991).

En contraste, en el ovario XY, los folículos no se formaron en la región medular y la actividad de la 3β -HSDH se localiza en las células epiteliales de los cordones medulares libres de oocitos. Los folículos primordiales en la región de la corteza continuaron su desarrollo en el ovario XX y XY (Taketo y cols., 1991).

c) Aspectos endocrinológicos

El ovario XY produce menores niveles de esteroides como la progesterona (P4), testosterona (T) y 17β -estradiol (17β -E2) comparado con el ovario XX normal. Además, no logra incrementar la producción de T como respuesta al PMSG (hormona homóloga a la FSH producida en la yegua) durante el período prepúber. (Villalpando y col., 1993). La hipófisis de la hembra XY es aparentemente normal ya que el trasplante de ovarios XX en hembras XY no impide la ciclicidad de ésta. Sin embargo, los ovarios XY transplantados a hembras XX no responden a la acción de las gonadotropinas, lo cual sugiere que el problema de esterilidad y falta de ciclicidad parece residir en el ovario XY (Taketo y col. 1991). Recientemente, Villalpando y col., 1996 demostraron que RNAm del factor semejante a insulina tipo 1 se encuentra retrasado en el ovario XY y se expresa hasta los 15 dpp comparado con el control (ovario XX).

3.0 Función de las gonadotropinas en la foliculogénesis

a) Organización anatómica y funcional de la hipófisis

La hipófisis está formada por la hipófisis posterior, la hipófisis intermedia y la hipófisis anterior o adenohipófisis. Esta última se origina embriológicamente de las bolsas de Rathke, como una evaginación del techo de la faringe (Austin y Short, 1982; Ganong, 1988). El control de la secreción hormonal de la pituitaria es, en parte, modulado por factores liberadores. Se han descrito 10 factores y se sabe que se pueden producir otros, cuya secreción es regulada por hormonas liberadas por el hipotálamo (Austin y Short, 1982).

i) Lóbulo anterior

La adenohipófisis está constituida por 6 ó 7 tipos de células secretoras que se diferencian en base a criterios ultraestructurales y producen las siguientes hormonas:

- TSH u Hormona estimulante del tiroides.
- LH u Hormona luteinizante.
- ACTH u Hormona adenocorticotropa.
- FSH u Hormona estimulante del folículo.
- GH u Hormona de crecimiento.
- PL u Prolactina.

La secreción de estas hormonas está controlada por centros hipotalámicos que comunican con la hipófisis anterior por vía de factores de liberación. Asimismo, los neurotransmisores como la dopamina, desempeñan un papel importante en estas regulaciones. Si bien todas las hormonas son importantes para mantener la homeostasis la LH y la FSH son de primordial importancia para la reproducción (Li y col., 1993).

Durante el ciclo ovulatorio la FSH estimula el crecimiento del folículo y la secreción de estrógenos y LH (que es semejante a la ICSH, hormona estimulante de las células intersticiales en testículo), produce la ovulación y aumenta la secreción de P4 en el cuerpo lúteo. La FSH y la LH actúan sinérgicamente para la maduración folicular. El aumento de LH tiene importancia ya que incrementa la presión interna del folículo y

produce la ruptura del mismo y las células de la granulosa empiezan a producir progesterona (P4). Los estrógenos y la progesterona ejercen una retroalimentación negativa sobre la secreción de las gonadotropinas (FSH y LH).

ii) Lóbulo posterior

La vasopresina y la oxitocina son dos hormonas que se han identificado y que tienen propiedades vasoactivas, antidiuréticas y oxitóxicas (Ganong, 1988).

b) Función de las gonadotropinas

Los mecanismos por los cuales la FSH y LH regulan la función de las células del ovario son complejos. Existen muchos factores que participan en la regulación de la expresión de genes de las células de la granulosa en el ovario, así como aquellos que conllevan a la diferenciación de estas células tales como: activación ligando-receptor de la adenil-ciclasa, producción de adenosina monofosfato cíclica (AMP c) y fosforilación de moléculas reguladoras y otras que participan en la regulación mediante AMPc (Richards, 1993; Richards y col., 1979 y 1987). En estudios previos en ratas intactas e hipofisectomizadas, se vió un aumento en los receptores a LH en las células murales de la granulosa si se administra estradiol seguido por FSH, lo cual indica que estas células contienen más receptores de LH que las del "cumulus ooforus" (Zelesnick y col., 1974; Amsterdam y col., 1975).

Channing y Seymour (1970); Lidner y col., (1974); Nilson y col., (1974) y Selstam y col., (1976) mostraron que la FSH estimulaba la producción de AMPc en el ovario. La identificación de cuatro proteínas específicas de unión para AMPc en el citosol del cuerpo lúteo de ovejas (Fletcher y col., 1976) y en otras células (Chambers y Studds, 1976), sugieren que la FSH induce un incremento en las células de la granulosa.

La LH juega un papel importante en la diferenciación folicular temprana, probablemente por la acción de ésta en las células de la teca (Lostroh y Johnson, 1966; Eshkol y Lunnenfold, 1972). Se sabe que ésta estimula la ovulación y la luteinización de los folículos antrales presentes en el proestro y se sabe poco acerca del efecto de la LH en

los folículos en crecimiento (Peluso, 1989). La LH es secretada para unirse sinérgicamente con la FSH para promover el crecimiento folicular; esto se ha observado al inyectar ratas hipofisectomizadas con FSH, lo cual provoca la inducción sostenida de una gran cantidad de receptores a LH y está relacionado con la aparición de folículos antrales (Richards y col., 1976). En la luteinización de los folículos antrales, existe una pérdida de receptores a LH o a FSH. Se ha sugerido que esto ocurre por otros mecanismos diferentes a la ocupación de los receptores de unión (Richards y col., 1976; Rao y col., 1977).

La LH tiene acción en algunos folículos antrales causando una pérdida de receptores a hormonas gonadotrópicas (LH y/o FSH), disminuyendo la respuesta de estos a la estimulación hormonal y probablemente al inicio de la atresia. La LH interacciona con su receptor membranal para estimular la esteroidogénesis no sólo por vía del AMP cíclico sino también por la vía del ácido araquidónico, leucotrienos y la regulación de canales de cloro y calcio (Steele y Leung, 1993). Los mismos patrones de estimulación conllevan a una regulación baja de LH y de la esteroidogénesis. El receptor de LH existe en un estado dinámico y la desensibilización es controlada por la proteína cinasa C (PKC) en la rata y por la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico en las células de Leydig de ratón (Cook y col., 1992). La FSH induce que la testosterona sea transformada a estradiol por la aromatasas P-450 (Moon y col., 1975; Makris y Ryan, 1977).

c) Receptores a FSH

En la mayoría de las especies de vertebrados, las células involucradas en la esteroidogénesis gonadal son de dos tipos básicos: (a) células con respuesta a LH, como las de la teca interna de la envoltura folicular y las células intersticiales del estroma o teca externa y (b) células con respuesta a FSH, como las células de la granulosa, las cuales más tarde en la maduración folicular también adquieren la habilidad de responder a la LH (Richards y col., 1976).

Las células de la granulosa de folículos preantrales poseen receptores a FSH, hasta que forman un antro folicular (cavidad presente en el ovario en el que se encuentran

factores de crecimiento, proteasas y otros requerimientos para el desarrollo de éste). En la etapa de folículos preantrales las células de la teca contienen receptores a LH pero no a FSH (Richards, 1980). Se ha visto que ésta última induce la síntesis de sus propios receptores, así como de los receptores a LH. Así mismo, se ha planteado que la FSH es requerida para el mantenimiento de los receptores a LH y FSH durante toda la foliculogénesis (Hillier y col., 1978 y Richards, 1980). La acción de las gonadotropinas en la gónada es mediada por receptores de gonadotropinas específicas localizadas en la membrana de células blanco (Richards, 1980).

4.0 Bioquímica de las hormonas esteroideas

El folículo produce esteroideas sexuales, los cuales son transportados por la circulación para actuar en los órganos "blanco" que comprenden además del sistema reproductivo, otros tejidos blanco, como el sistema nervioso central, el inmune, el hígado, el tejido adiposo y el cutáneo (Gore-Langton y Armstrong, 1988). Varias evidencias sugieren la compartimentalización de la actividad esteroideogénica en el ovario (Fortune y Armstrong, 1977). El tejido intersticial es fundamentalmente androgénico y las células de la granulosa sintetizan principalmente estrógenos, éstas células después de la ovulación, se transforman en células luteinizantes que forman los cuerpos lúteos y secretan progesterona, como ya se mencionó. Los testículos y los ovarios además de su función de proveer espermatozoides y óvulos producen hormonas esteroideas que gobiernan los caracteres sexuales secundarios, el ciclo reproductor, el crecimiento y desarrollo de órganos reproductores accesorios además de ejercer una intensa actividad anabólica y metabólica proteínica (Fortune y Armstrong, 1977).

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

a) Colesterol unido a lipoproteínas circulantes que es tomado de la sangre, LDL (lipoproteínas de baja densidad) en el hombre y en otros vertebrados (Rajendran y col., 1983) y HDL (lipoproteínas de alta densidad) en el ratón (Gwynne y Strauss III, 1982).

Se ha demostrado que ésta es la fuente más importante de colesterol (Strauss III y col., 1981).

b) Colesterol preformado y almacenado dentro de la célula de la teca del ovario, como colesterol libre, un constituyente de la membrana celular o liberado del citoplasma celular de gotas lipídicas que almacenan cantidades importantes de colesterol en gotas lipídicas intracelulares en forma de ésteres de colesterol y ácidos grasos de cadena larga y como colesterol libre. El balance entre ambos es mantenido por: la colesterol aciltransferasa y la colesterol estereasa; la acción de la primera favorece el almacenamiento de colesterol en forma esterificada y la segunda permite su movilización posterior (Strauss III y col., 1981).

c) Colesterol sintetizado *de novo*, a partir de acetato, derivado del metabolismo de carbohidratos, grasas o proteínas dentro de la célula (Strauss III y col., 1981). En estadios foliculares antrales y preovulatorios, el colesterol intracelular es probablemente derivado de la síntesis *de novo* y una pequeña parte almacenado en lípidos endógenos (Chang y col., 1976; Simpson y col., 1980).

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

a) Clasificación bioquímica

Hay tres clases de esteroides que se producen en los ovarios:

a) Progestanos, b) Androstanos y c) Estranos.

La primera clase está representada por las progestinas que están formadas por 21 carbonos, la segunda por los andrógenos con 19 átomos de este elemento y la tercera categoría por los estrógenos con 18 átomos de carbono. Todos ellos comprenden en su estructura un esqueleto complejo, compuesto de tres anillos de ciclohexano (A, B, C) y

un anillo de ciclo pentano (D), el cual es conocido como núcleo ciclopentano perhidrofenantreno (Kellie, 1984).

b) Células esteroideogénicas del ovario

El ovario secreta dos tipos principales de hormonas femeninas: el estrógeno producido por las células de la granulosa y la progesterona que deriva de las células del cuerpo lúteo que se forma en el ovario después de la ruptura del folículo, como ya se mencionó.

i) Estrógenos

Estos son el 17- β -estradiol, la estrona y el estriol, éste último se produce exclusivamente durante el embarazo (Doisy y col., 1929; MacCorquodale, 1936 y Short, 1961). Hay evidencias que indican que las células de la granulosa de folículos antrales grandes y preovulatorios son los únicos sitios de actividad de la aromatasa en el ovario y de la biosíntesis de estrógenos (Thompson y Siiteri, 1974). La FSH regula la aromatización en todas las especies estudiadas (Dorrington y col., 1975). Estudios realizados con células de la granulosa en rata sugieren que la aromatasa dependiente del citocromo P-450, es inducida por la FSH y por el dibutiril AMPc (Mendelson y col., 1985). La biosíntesis de estrógenos requiere la cooperación de las células de la teca que suministran los andrógenos para la aromatización. La aromatasa citocromo P-450 cataliza la aromatización de los andrógenos para formar estrógenos. Los andrógenos, testosterona y androstendiona, son precursores en la síntesis de los estrógenos en los testículos, ovarios, la glándula suprarrenal y la placenta. La conversión a partir de la testosterona incluye tres pasos catalizados enzimáticamente que requieren oxígeno y NADPH: 1) una hidroxilación en C-19 para formar 19-hidroxitestosterona o 19-hidroxiandrostendiona; 2) 19-oxidación para formar los cetoderivados; y 3) liolisisaldehydica para eliminar el grupo cetónico en 19 y causar aromatización del anillo (Rawn, 1989; Yamada y col., 1973).

ii) Andrógenos

La testosterona es sintetizada por la actividad de las células de la teca a partir del colesterol pasando por pregnenolona, progesterona, hidroxiprogesterona, la cual es entonces convertida en el octoesteroide C-19; la androstendiona es un precursor inmediato de la testosterona. Alternativamente, la vía a través de la hidroxipregnenolona y la dehidroepiandrosterona (DHEA) se puede usar para producir androstendiona. La androstendiona y la testosterona pueden ser convertidos en 17- β -estradiol y estrona.

Las células de la teca y las células intersticiales están involucradas en la producción *de novo* de andrógenos; mientras que en las células de la granulosa se encuentran organizadas las rutas biosintéticas del metabolismo de conversión de esteroides de 19 carbonos a estrógenos y de la síntesis *de novo* a progesterona y sus derivados de 21 carbonos, después de la ovulación (Amstrong y Papkoff, 1976).

iii) Progestinas

En este grupo la pregnenolona, es la más importante y es producida en el ovario, ésta es la precursora de todos los esteroides sexuales. Sin embargo, el producto más importante de 21-carbonos en el folículo es la progesterona. Este esteroide es sintetizado como intermediario de todos los estadios de crecimiento en el desarrollo folicular y como un producto final en los periodos pre y postovulatorio (Zmigrod y col., 1972 y Amstrong, 1979). La producción de progesterona y sus metabolitos, en las células de la granulosa en los folículos antrales y preovulatorios, ocurre inicialmente en respuesta a FSH (Dorrington y col., 1975). Se ha visto que el paso limitante para que ocurra la reacción de biosíntesis de la progesterona, ya que es regulado por la acción de la FSH, es la división de la cadena del colesterol por la 20, 20-desmolasa (Jones y Hsueh, 1982; Toaff y col., 1983, Hsueh y col., 1977).

5.0 Control de la producción de esteroides

La función normal del ovario depende de una diversidad de hormonas que actúan a través de mecanismos de acción endócrinos, parácrinos y autócrinos. Algunos procesos

del ovario requieren la acción sinérgica de hormonas mientras que otros dependen del efecto antagónico de muchos factores. Las hormonas traducen información vía mecanismos de señalización que emplean mensajeros intracelulares tales como: AMPc, iones calcio (Ca^{2+}) y ácido araquidónico (Steele y col., 1993). En el ratón, la formación de folículos es principalmente posnatal (Merchant-Larios y Chimal-Monroy, 1989) y los cambios en la esteroidogénesis del ovario en este periodo reflejan cambios en la actividad folicular durante la foliculogénesis temprana. Sin embargo, la morfología del ovario y la función endócrina parecen ser independientes de las gonadotropinas durante la primera semana de vida posnatal. Armstrong y col. (1979) proponen que la esteroidogénesis ovárica en el periodo temprano posnatal depende de cambios en la actividad del nivel de enzima 20,22 desmolasa (CSCC) más que de la existencia de receptores de gonadotropinas o la estimulación por la prostaglandina E2 (PGE2). Al nacimiento, el ovario contiene folículos primordiales y una gran cantidad de tejido estromático además de un pequeño pero significativo efecto en progesterona debido a AMPc, asociado a niveles detectables de 20/22 desmolasa (Fortune y col., 1977). En el día 3, el tejido estromático ha disminuido en abundancia y la actividad esteroidogénica ha desaparecido, por lo que el tejido estromático puede ser el componente esteroidogénico activo. Entre los días 5 y 7, la morfología del ovario muestra dos cambios asociados a la actividad esteroidogénica, primero hay un incremento en el número de folículos secundarios y después hay una diferenciación en el tejido de la teca (Murphy y O'Shaughnessy, 1991). Para el día 7, la LH estimula un aumento en la progesterona y la androstendiona, sin efecto de FSH. En el ovario, el tejido intersticial y de la teca responden a la LH, generando incremento en la esteroidogénesis y la formación de andrógenos (Erickson y col., 1989; Magoffin y Erickson, 1982 y 1988; Armstrong y Papkoff, 1976) es por lo tanto que la progesterona es el metabolito principal a partir de la pregnenolona y la androstendiona es el principal esteroide c19. (Mannan y O'Shaughnessy, 1988; O'Shaughnessy y col., 1989).

En contraste, las células de la granulosa responden a FSH sólo hasta poco antes de la ovulación, pero son capaces de producir estrógenos en el día 7, ya que la aromatasa está

CELULA DE LA TECA O CELULA INTERSTICIAL

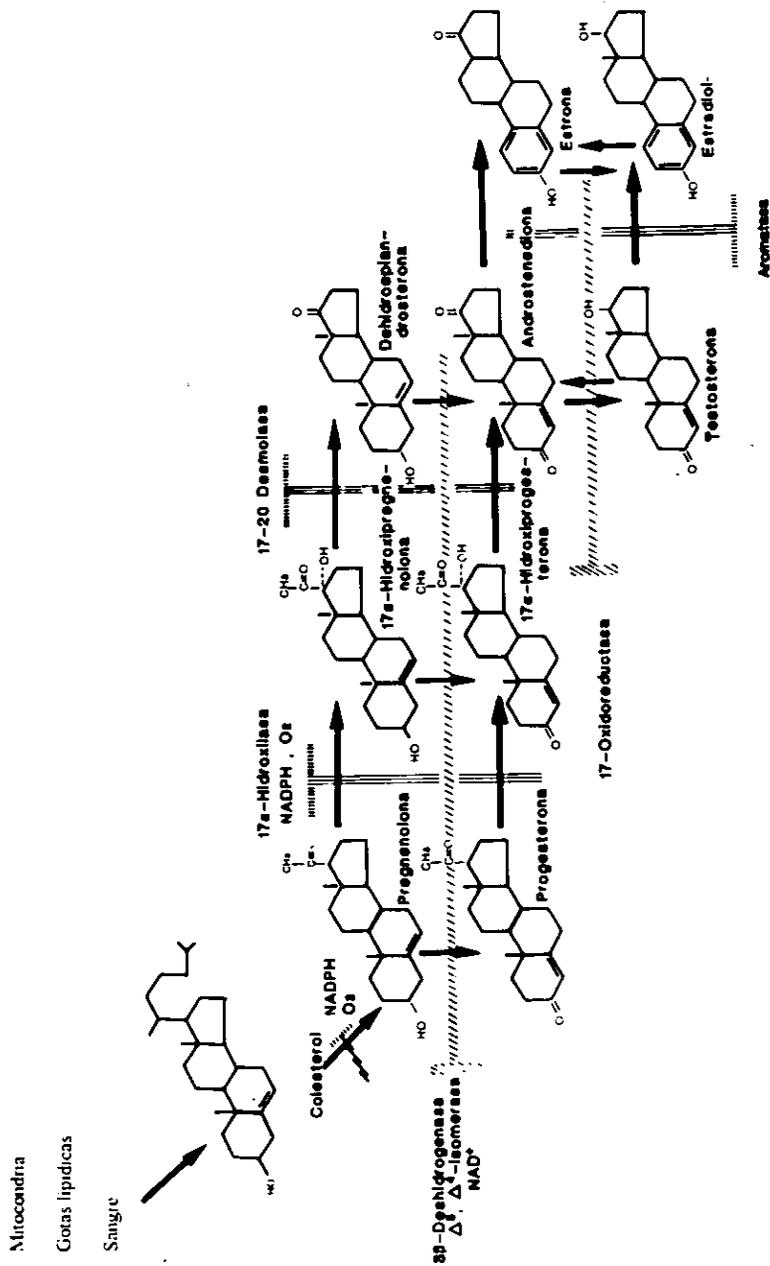


Tabla 1. Esquema en el que se muestra la biosíntesis de esteroides así como las enzimas esteroideogénicas que participan en la formación de metabolitos importantes para el funcionamiento del ovario de los mamíferos. (Modificado de: Adashi E. y Leung P. 1993. The Ovary. Raven Press Inc. New York).

presente a esta edad o incluso antes. La actividad basal de la aromatasa esta presente entre los 5 y 7 días y aumenta con la edad. Entre los días 7 y 21, la actividad de la 5 α -reductasa se incrementa en el ovario de ratón, pero los niveles de metabolitos-5 α de C19 y C21 reducidos se mantienen bajos comparados con progesterona y androstendiona (Mannan y O'Shaughnessy, 1988).

Es posible que los cambios en la esteroidogénesis ovárica estén relacionados a cambios de niveles en las gonadotropinas circulantes así como a cambios en el desarrollo folicular. Mannan y O'Shaughnessy (1991) proponen que hay un incremento en la esteroidogénesis en el día 7 en el ratón y sugieren que durante la foliculogénesis existe una esteroidogénesis dependiente de gonadotropinas en el tejido de la teca del folículo secundario.

6.0 Función del factor semejante a insulina tipo I

a) Factores de crecimiento

Diversas evidencias sugieren que los factores ováricos pueden modular la acción de LH por mecanismos autócrinos y parácrinos. Entre los factores que estimulan la proliferación de las células de la granulosa se encuentran: el factor del crecimiento del fibroblasto (FGF), el factor semejante a insulina (IGF), el factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF- β) (Skinner y col., 1987; Skinner, 1993). Dos de estos factores, el IGF-I y el TGF- β , son secretados por las células de la granulosa y el TGF- β es producido por las células de la teca (CT). Aunque se ha probado que la IGF-I incrementa la síntesis de andrógenos CT estimuladas por LH (Adashi, 1986b).

Algunos de los niveles en los cuales las hormonas reproductivas actúan junto con los factores de crecimiento son: (1) regulación de la producción de factores de crecimiento por hormonas reproductivas; (2) modulación de la expresión del receptor del factor de crecimiento; (3) modulación de la producción de hormonas reproductivas por factores de crecimiento y (4) relación del factor de crecimiento en la regulación de la expresión /

función de los receptores para las hormonas reproductivas (Baranao y Hammond, 1984; Veldhuis, 1989; Veldhuis y Hammond, 1986).

Un número de diferentes factores de crecimiento afectan el crecimiento de las células de la granulosa, lo que puede derivar en el control de la expansión de células del folículo. El IGF-I se produce en las células de la granulosa e influye en el crecimiento y las funciones de éstas, así como la diferenciación de los muchos tipos de células ahí presentes; por lo tanto, el IGF-I, tiene un papel integral en el control de las funciones de las células ováricas, en la diferenciación y en la regulación hormonal (Veldhuis y Demers, 1985; Veldhuis y col., 1985; Zoller y Weisz, 1978).

b) Características

Hay factores de crecimiento que tienen efectos moduladores *in vitro* e *in vivo* en la diferenciación funcional de las células de la granulosa, incluyendo efectos esteroideogénicos en varias especies de vertebrados; uno de estos factores es el factor semejante a insulina tipo I o IGF-I, sin embargo hasta la fecha se desconocen las concentraciones reales de éste dentro de los folículos en los diferentes estadios de desarrollo, el curso celular que sigue dentro del ovario o en tejidos extraováricos y cómo se regulan estos procesos (Zoller y Weisz, 1979; Veldhuis y Hammond, 1986).

Existen dos formas, el IGF-II y el IGF-I, el primero está involucrado en una actividad estimuladora de multiplicación (MSA) en el crecimiento fetal (Sussenbach y Steenberg, 1991). El IGF-I es sintetizado en diferentes tejido, como útero, riñón y sistema nervioso, aunque se produce en mayor cantidad en el hígado (Murphy y col., 1987 y Daughaday y Rotwein, 1989).

c) Funciones

Algunas hormonas glicoproteicas, como la FSH y LH, parecen ser fundamentales para la ampliación de los efectos del IGF-I. Se ha comprobado que el mayor estimulador para la producción de IGF-I en el hígado es la hormona de crecimiento (Murphy y col., 1987; Isgaard y col., 1989), sin embargo también se ha visto que la FSH y la LH

desempeñan una función importante en la esteroidogénesis. Se ha demostrado que el IGF-I posee varias funciones modulatorias, ya que se ha observado que en presencia de FSH, uno de los efectos del IGF-I sobre las células de la granulosa de rata cultivadas en ausencia de suero, es aumentar la producción de progesterona y 20- α -dihidroprogesterona 10 y 4 veces, respectivamente (Adashi y col., 1984 y 1985a) y potenciar la actividad de la aromatasa (Adashi y col., 1985b). Así mismo, el IGF-I hace más potente la acción estimuladora del AMPc sobre la biosíntesis de progesterona (Adashi y col., 1986b).

Empleando células de la granulosa de cerdo *in vitro* se ha demostrado que el IGF-I es un potente mitógeno y que además, interactúa con la FSH de manera sinérgica incrementando la producción de andrógenos y estrógenos (Baranao y Hammond, 1984; Wood y col., 1994; Hsu y Hammond, 1987). En ausencia de FSH, el IGF-I tiene un efecto estimulador sobre la secreción de progesterona en células de la granulosa de cerdo y conejo (Veldhuis y Demers, 1985; Cassandra y col., 1991) e induce la síntesis de receptores a LH en las células de la granulosa (Davoren y col., 1986). En rata, la acción del IGF-I incrementa la actividad de la aromatasa, lo que provoca un aumento en la síntesis de pregnenolona y la actividad de la 3- β -HSD con el consecuente aumento en la acumulación de progestinas (Davoren y Hsueh, 1984, 1985).

El IGF-I puede aumentar los índices de progestina en las células del ovario al activar cuatro mecanismos complementarios: (1) estimular la unión, incremento celular y utilización efectiva de lipoproteínas de alta densidad, como proveedoras de esteroides (LDL y HDL); (2) incrementar la síntesis *de novo* de colesterol; (3) facilitar la remoción de ésteres de colesterol y (4) incrementar la ruptura de la cadena lateral de colesterol y estimular la síntesis de proteínas involucradas en este proceso. Esta función del IGF-I indica que juega un papel importante en la diferenciación esteroidogénica de las células de la granulosa y del cuerpo lúteo durante el desarrollo folicular preovulatorio (Maggofin y Erickson, 1993; Hernandez y col., 1988).

La acción de la FSH produce un aumento en la capacidad de unión del IGF-I en las células de la granulosa de rata (Adashi y col., 1989) y este efecto parece estar mediado por AMPc (Adashi y col., 1986a). Algunos estudios muestran que el IGF-I al unirse a sus

receptores se generan una serie de agonistas que inhiben la actividad de la fosfodiesterasa o la administración de análogos de AMPc no degradables y los niveles de este nucleótido se elevan intracelularmente (Adashi y col., 1988), lo que sugiere que los receptores para IGF-I son dependientes de AMPc.

d) Proteínas de unión

Se han aislado y caracterizado cuatro proteínas específicas de unión para IGFs (IGFBP) (Brewer y col., 1988; Wood y col., 1994; Shamasaki y col., 1990) presentes en el suero humano, las cuales son conocidas como IGFBP-1,2,3 y 4. La secreción de IGFBP-3 es estimulada por el IGF-I (Clemmons y col., 1989), mientras que la regulación de las concentraciones en el plasma de IGFBP-1 e IGFBP-2 es más compleja. Estas dos proteínas difieren en el dominio responsable de la adherencia celular y relacionada con la capacidad de la IGFBP-31 al potenciar el crecimiento celular en respuesta al IGF-I.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Cuando la cepa del ratón *Mus musculus musculus* C57BL/6J (B6) se cruza con la cepa del ratón *Mus musculus poschivianus* el 25% de la progenie B6Y.^{DOM} en la vida posnatal se desarrollan como hermafroditas verdaderos, 25% como hembras XY, 25 % como machos y el otro 25% como hembras normales. Las hembras XY producen niveles bajos de esteroides sexuales como P4, testosterona y 17- β estradiol y desarrollan problemas de esterilidad. La baja producción de esteroides en el ovario XY no parece ser mediada por diferencias en la producción de AMPc ya que los niveles endógenos de este segundo mensajero en el ovario XY a los 14 dpp son similares a los presentes en el ovario XX, etapa en la que ocurren cambios endocrinológicos importantes (Guerrero, 1994).

Por otra parte, se sabe que hay factores de crecimiento, entre éstos el IGF-I, que regulan la producción de esteroides ováricos de manera autócrina y parácrina en las células foliculares e intersticiales en diferentes especies de vertebrados como: ovino, conejo, cerdo, bovino y rata. Se ha demostrado que en presencia del IGF-I más FSH y/o LH la producción de P4 y andrógenos se incrementa considerablemente *in vitro*. Sin embargo, en el ratón a pesar, de su importancia como modelo biológico en la investigación biomédica se desconocen los factores que controlan la producción de esteroides en esta especie y no se ha estudiado el efecto del IGF-I en el desarrollo folicular temprano, es decir durante el período infantil. Asimismo, de estudios previos se sabe que la P4 es el factor limitante en la síntesis de esteroides producidos en el ovario de los mamíferos. La hipótesis planteada en este trabajo es que el IGF-I en presencia de la FSH incrementa la síntesis de P4 en los ovarios XX y XY *in vitro* en la etapa infantil al igual que en otras especies de mamíferos en la vida adulta. Debido a las razones expuestas anteriormente, consideramos importante evaluar la producción de P4 en los ovarios infantiles en la cepa B6Y.^{DOM} en el período comprendido entre los 10-16 dpp, ventana del desarrollo posnatal, en donde empiezan a formarse los folículos primarios y preantrales.

IV. OBJETIVOS

- 1) Estandarizar la técnica de cultivo de órganos en rotación y aprender la técnica de radioinmunoensayo de fase líquida para cuantificar progesterona en los ovarios prepúberes durante el desarrollo folicular temprano.
- 2) Evaluar *in vitro* el efecto del factor de crecimiento semejante a insulina tipo I de 10 a 16 dpp de la cepa B6.Y^{DOM}
- 3) Determinar si la FSH tiene un efecto sinérgico con el IGF-I en la producción de progesterona en los ovarios infantiles XX y XY de 10 a 16 dpp.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1.0 Identificación del sexo genético de las hembras XY

a) Prehibridación

La identificación de las hembras XX normales de las XY se realizó con la prueba de hibridación puntual. Los fragmentos de DNA utilizados para hacer el sexado de ratones fueron aquellas secuencias altamente repetidas en el cromosoma Y el cual está constituido principalmente por DNA satélite localizado en la heterocromatina en la parte distal del brazo largo de este cromosoma (Cooke, 1976).

Se obtuvieron 3 μ l de sangre periférica de la cola de ratones B6Y.^{DOM} de 10 a 16 dpp. Se colocaron en una membrana cargada positivamente (Gene Screen Plus, Hybridization Transfer Membrane de Biotechnology Systems (NEN Research Products) y se horneó 2 horas a 80°C al vacío. La membrana se desnaturizó en NaOH 0.3M y NaCl 0.5 N 1 hora, se neutralizó en una solución amortiguadora Tris 1M pH 7.0 a temperatura ambiente y se prehibridó en 10 ml de solución de hibridación. La hibridación se realizó de acuerdo al protocolo publicado por Nishioka, 1968; Nishioka y Lamotte, 1986 (ver descripción abajo).

b) Hibridación

La sonda 145SC5 se obtuvo a partir del aislamiento de una secuencia cromosomal de Y denominada AC11 y contiene 1.5 kb del fragmento subclonado EcoR1 en pUC8 (Nagamine, 1988). Ésta sonda se marcó con ³²P-dCTP (ICN Canada, Montreal, Quebec) por el método de secuencias al azar de acuerdo al protocolo descrito en el estuche comercial de (GIBCO-BRL). La sonda se desnaturizó 10 minutos a 90°C y se enfrió a 4°C. Asimismo, se desnaturizó esperma de salmón a una concentración de 10 mg/ml e inmediatamente se puso en hielo en escarcha. Se agregaron 1×10^6 cpm de la sonda marcada y el esperma de salmón a 10 ml de la solución de hibridación y se incubó a 42°C 18 horas. Se lavó con SSC 1X y dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0.15% 60°C, 20

minutos 2 veces. La membrana se expuso a una película X-O-MAT de Kodak en un portaplacas con una placa intensificadora y se incubó a -70°C , 3 días. Se reveló con un revelador D-76 de Kodak 5 minutos, se enjuagó 5 minutos, se fijó y se enjuagó con agua corriente. Únicamente los individuos que tienen las secuencias repetidas del cromosoma Y fueron positivos a esta prueba.

1.1 Cultivo organotípico por rotación.

En un cuarto en condiciones de esterilidad, se preparó el siguiente medio de cultivo empleando medio de cultivo (Minimal essential medium, MEM) al que se le adicionaron: 10 $\mu\text{g/ml}$ de insulina (SIGMA), 110 $\mu\text{g/ml}$ de piruvato de sodio (SIGMA), 200 nM L-glutamina (SIGMA), 50 UI penicilina G sódica (GIBCO-BRL), 50 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de estreptomicina (GIBCO-BRL). Se tomaron 10 ml del medio antes descrito y se separaron 5 ml a los que se agregaron 0.1 UI de FSH (Folligon, INTERVET INTERNATIONAL) y 1 $\mu\text{g/ml}$ de pregnenolona (SIGMA).

Una vez preparado el medio de cultivo con y/o sin hormona, se filtró inyectándolo a través de un filtro millipore estéril cuyo diámetro de poro fue de $0.22 \mu^3$ y se colectó en otro tubo estéril. Se colocaron 500 μl del medio en tubos de vidrio de la marca Pyrex para cada muestra.

Se utilizaron ratones de la cepa B6Y.^{DOM} pertenecientes a la colonia de la Dra. Irma Villalpando Fierro en el IIB, UNAM. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones de luz-oscuridad en periodos de 12 horas (6 a.m. a 6 p.m.) y fueron alimentados con Mouse Diet 5051 de Lab. Diet (DMI Feeds Inc.). La temperatura promedio fue de 18°C a 23°C .

Se aislaron los ovarios de ratones B6Y.^{DOM}, se les quitó el tejido graso y se cortaron en cuatro fracciones. Estas se colocaron en un tubo con medio de cultivo y se incubaron en un aparato de rotación en una estufa (National Appliance Co, modelo 8941-2) a 37° con 5% de CO_2 , 24 horas. Las muestras se mantuvieron en congelación a -20°C en un congelador (Puffer Hubbard) hasta la cuantificación de los esteroides por radioinmunoensayo (RIA).

1.2 Determinación de progesterona

a) Radioinmunoensayo

Los radioinmunoensayos dependen de la habilidad del anticuerpo para unirse a su antígeno (radiactivo) mientras que otro antígeno (no radiactivo) compite por un número limitado de sitios de unión en un anticuerpo específico. Mientras más antígeno no radiactivo se introduce al sistema, quedan menos sitios de unión para unirse con el antígeno radiactivo y de esta manera se cuantifica el antígeno en la muestra.

En el caso de este estuche comercial (Immuno Chem IM Progesterone assay) una cantidad limitada del anticuerpo específico se hace reaccionar con la hormona correspondiente marcada con un radioisótopo (H^*). Debido a la adición de un exceso de hormona sin marca radioactiva (H) se provoca que por competencia una cantidad menor de H^* se una al anticuerpo. Después de la separación del complejo antígeno-anticuerpo del H^* libre por diversos métodos, la cantidad de radioactividad en una o ambas fracciones se evalúa en un contador gamma calibrado para I^{125} y el nivel de progesterona marcada en las muestras se determina gráficamente con una curva estándar.

b) Preparación de soluciones para radioinmunoensayo

Para la cuantificación de progesterona en las muestras se utilizó un estuche comercial para P4 marcado con I^{125} de ICN Biomedicals Inc. Las soluciones estándares utilizadas en la curva estándar se prepararon a partir de una solución inicial de pregnenolona (1 mg/ml) y los estándares preparados tuvieron las siguientes concentraciones: 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 y 10 ng/ml.

c) Procedimiento

Se pipetearon 500 μ l de la solución diluyente a los tubos 1 y 2 y se adicionaron 100 μ l del estándar de 0 ng/ml de P4 a los tubos 1, 2, 3 y 4. Se añadieron 100 μ l de solución estándar, controles y muestras a los tubos respectivos.

Se añadieron 500 μ l del anticuerpo anti-progesterona a todos los tubos empezando a partir del 3. Se adicionaron 200 μ l de progesterona I¹²⁵ a todos los tubos, se agitaron y se incubaron en un baño de agua a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ 60 minutos. Se adicionaron 500 μ l de la solución precipitante a todos los tubos, se agitaron asegurándose que estaban tapados y se centrifugaron a 1000 X g, 20 minutos. Se decantó el contenido de los tubos utilizando papel absorbente y se obtuvieron las lecturas en cpm. en un contador gamma (PACKARD AUTO-GAMMA 5650) calibrado para I¹²⁵. Se calcularon y graficaron los resultados usando la fórmula:

$$\%B/B0 = [\text{Avg CPM (muestra)} - \text{Avg CPM (NBS)}] / (\text{Avg CPM (estándar)} - \text{Avg CPM (NBS)}) \times 100.$$

Donde: %B/B0 es el porcentaje de P4 calculado para cada muestra; Avg CPM (NBS), (muestra) y (estándar) son los promedios de cuentas por minuto detectadas para la unión no específica, las muestras experimentales y los estándares empleados en la curva, respectivamente.

2.0 Microscopía electrónica

a) Fijación

Se aislaron los ovarios de hembras XX y XY de 10 a 16 dpp de la cepa B6Y.^{DOM} y se fijaron en Karnovsky (Karnovsky, 1965) a 4° C de 2 a 6 horas en un tubo o Eppendorf o en una caja de Petri. Después se lavaron con una solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.1 M (pH=7.3) 15 min., tres veces a 4°C. Finalmente los tejidos se cambiaron a tetraóxido de osmio 1% (OSO⁴) 24 horas, a 4° C.

Karnovsky: Mezcla de paraformaldehído (2%) con glutaraldehído (2.5%) y una solución amortiguadora de cacodilato de sodio (0.1 M, pH=7.3).

b) Deshidratación

Se deshidrataron los ovarios en alcoholes decrecientes del 70% al 95% 20 minutos a temperatura ambiente. Después se realizaron dos cambios de etanol absoluto de 20

minutos cada uno. Finalmente se hicieron dos cambios con óxido de propileno absoluto (20 minutos cada uno).

c) Preinclusión

El tejido se incluyó en Epon 1:1 (se mezcló una parte de Epon con una parte de etanol absoluto) 24 horas. Después en Epon 2:1 (se mezclaron dos partes de Epon con una parte de etanol absoluto) 24 horas. Finalmente se impregnó en Epon 3:1 (se mezclaron tres partes de Epon con una parte de etanol absoluto) 24 horas.

-Preparación del Epon.

Mezclar 7 partes de la solución A con 3 partes de la solución B (3 ml A +3 ml B).

Solución A: 50 ml Epon 812 + 81 ml DDSA (anhídrido dodecenil succínico)

Solución B: 50 ml Epon 812 + 44 ml NMA (anhídrido metil nádic)

Agregar 0.15 ml de catalizador (2,4,6-tri (dimetilanimometil) fenol, DMP30)

y revolver la mezcla despacio, tratando de que no se formen burbujas, 10 minutos.

d) Inclusión

La inclusión se hace con Epon fresco en moldes planos y se hornea 24 horas a 60°C.

c) Corte

Se obtuvieron cortes de 1-2 μ , se tiñeron con azul de toluidina caliente y se enjuagaron con agua, etanol absoluto y nuevamente con agua. Los cortes ya teñidos se montaron en portaobjetos para ser finalmente observados en el microscopio óptico (Nikon Optiphot).

Azul de toluidina: Pesar 5.0 g de azul de toluidina, disolverlos en 300 ml de agua destilada, agregar 40.0 g de tetraborato de sodio, aforar a 1 l con agua destilada y hervir 15 minutos. Filtrar en frío.

VI. RESULTADOS

1.0 Generalidades sobre la prueba ANOVA

Los datos obtenidos en los experimentos fueron evaluados por un análisis de varianza (ANOVA) cuyo propósito es evaluar las diferencias significativas entre los promedios (media) de los grupos y dentro de los mismos. La gran ventaja de este análisis estadístico sobre la T de student's para variables dependientes es que para el tipo de experimentos realizados en este estudio, ANOVA puede encontrar un efecto significativo con un número menor de observaciones que las que se requieren para una prueba de T de student's. Asimismo, ANOVA permite detectar los efectos de la interacción entre variables y por lo tanto evaluar hipótesis más complejas en una investigación; además de controlar el error de varianza e incrementar la sensibilidad de la prueba.

Se partió de las siguientes hipótesis:

Ho: La varianza entre los individuos de cada grupo deberá ser semejante a la varianza debida a la variabilidad entre grupos.

Hi: La varianza entre los individuos de cada grupo deberá ser diferente a la varianza debida a la variabilidad entre grupos.

2.0 Efecto del IGF-I en la producción de progesterona

a) Cultivos con y sin FSH

En la tabla de promedios (Tabla 1, figura 1), los ovarios que fueron cultivados con FSH produjeron concentraciones mayores de P4 (4.88 ng/ml) que aquéllos que fueron incubados sin FSH (4.42 ng/ml), aunque las diferencias observadas no son estadísticamente significativas a un intervalo de confianza de $p < 0.1$. Para esta variable se encontró: $F(1,101) = 0.33$; $p < 0.5663$. Donde, F es la relación entre las dos varianzas. Si F es significativamente mayor a 1 significa que los promedios observados en los grupos son estadísticamente significativos y P es el nivel de confianza igual a $p < 0.1$.

Hormona	Valores de P4
+FSH	4.88 ng/ml
-FSH	4.42 ng/ml

Tabla 1. Valores de P4 detectado con y sin FSH.

b) Valores de P4 obtenidos con la variable edad

Se observó que en los ovarios B6Y.^{DOM} el factor edad influye de manera determinante en la síntesis de P4 ya que se vió un decremento en la producción de P4 en las edades de 10 a 12 dpp (5.85 a 3.93 ng/ml). Asimismo, se observó que los niveles de P4 aumentan en el día 13 dpp (6.66 ng/ml). También se vió que la síntesis de esta hormona decrece bruscamente del día 14 al 16 dpp en que se detectaron 3.41 ng/ml que es aproximadamente la mitad del valor observado en el día 13 dpp. Para esta variable se encontró: $F(5,101)=2.0$; $p<0.0846$ (Tabla 2).

Edad	Valores de P4
10 dpp	5.85 ng/ml
11 dpp	3.93 ng/ml
12 dpp	3.12 ng/ml
13 dpp	6.6 ng/ml
14 dpp	4.94 ng/ml
16 dpp	3.41 ng/ml

Tabla 2. Valores de P4 detectados de los 10-16 dpp.

c) Valores de P4 observados con la variable sexo genético

Los ovarios XX produjeron concentraciones mayores de P4 (5.17 ng/ml) comparados con los ovarios XY (4.13 ng/ml). Sin embargo, las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas a un intervalo $P<0.1$. Para esta variable se encontró: $F(1,101)=1.65$; $p<0.2013$ (Figura 2 y tabla 3).

Sexo genético	Valores de P4
XX	5.17 ng/ml
XY	4.13 ng/ml

Tabla 3. Valores detectados de P4 en los ovarios XX y XY.

3.0 Interacción de las variables

a) Hormona-edad

En la figura 3 se observa que los ovarios que fueron cultivados con FSH produjeron concentraciones menores de P4 a los 10 dpp (3.90 ng/ml). En los ovarios cultivados sin FSH se encontró un decremento a los 11 y 12 dpp (3.48 ng/ml) en que la concentración de P4 llega a estar por debajo de la concentración inicial observada (7.79 ng/ml). Después la síntesis de P4 se mantuvo estable hasta el día 12 dpp y posteriormente aumentó en el día 13 dpp (5.37 ng/ml) para finalmente presentar un decremento en el día 14 (2.93 ng/ml) y un ligero aumento en el día 16 dpp (3.50 ng/ml). Por otra parte, los ovarios cultivados con FSH alcanzaron un máximo en la síntesis de este metabolito igual a 7.94 ng/ml en el día 13 dpp para después disminuir la producción del día 14 dpp en adelante Para esta interacción de variables se encontró: $F(5,101)=1.89$; $p<0.1033$ (figura 3, tabla 4).

Hormona-Edad

Hormona	Edad	Valores de P4 (ng/ml)	Hormona	Edad	Valores de P4 (ng/ml)
-FSH	10 DPP	7.79	+FSH	10 DPP	3.90
-FSH	11 DPP	3.48	+FSH	11 DPP	4.37
-FSH	12 DPP	3.42	+FSH	12 DPP	2.81
-FSH	13 DPP	5.36	+FSH	13 DPP	7.94
-FSH	14 DPP	2.93	+FSH	14 DPP	6.94
-FSH	16 DPP	3.50	+FSH	16 DPP	3.32

Tabla 4. Valores detectados de P4 con y sin FSH de los 10-16 dpp.

b) Hormona-sexo genético

En la figura 4 se observan que tanto en los cultivos con FSH como sin ésta, los ovarios XX produjeron cantidades mayores de P4 que los ovarios XY. Aunque, de acuerdo al valor de p los datos no son estadísticamente significativos ($F(1,101)=0.20$; $p<0.6551$) a un intervalo de confianza de $p<0.1$, se ve que existe una tendencia a que las diferencias encontradas sean significativas si se incrementa el número de muestras.

c) Edad -sexo genético

En la figura 5 se observan las gráficas correspondientes a la interacción de las variables edad y sexo genético. A los 10 dpp las diferencias en la producción de P4 no fueron significativamente importantes entre los individuos XX (5.49 ng/ml) y los XY (6.20 ng/ml); aunque los XY produjeron más P4. Aunque las diferencias observadas son grandes, el que los promedios no sean estadísticamente significativos podría deberse a que las desviaciones estándar son muy grandes (Figura 9).

De los 11 dpp a los 12 dpp los ovarios XX (4.46 y 5.21ng/ml) produjeron más P4 que los XY (1.79, 2.65 ng/ml). A los 13 dpp los ovarios XY (8.45 ng/ml) produjeron más P4 que los XX (4.86 ng/ml). De los 14 dpp a los 16 dpp los ovarios XX (4.18 y 6.84 ng/ml) produjeron más P4 que los XY (2.65 y 3.04 ng/ml).

Sin embargo, estos datos no son estadísticamente significativos con un intervalo de confianza de $p=0.1$. Para esta interacción de variables se encontró: $F(5,101)=1.85$; $p<0.1092$.

d) Interacción de todas las variables

En la figura 6, se muestra que los ovarios XX cultivados con FSH produjeron más P4 (11.20 ng/ml) que los ovarios XX que no fueron cultivados con la hormona (6.40 ng/ml). En los ovarios XX cultivados sin FSH la producción de P4 es mayor que en los ovarios XX a los 10 dpp cultivados con FSH. La producción máxima se alcanzó a los 12 dpp en los cultivos XX sin FSH y a los 14 dpp en los cultivos con FSH. Por otra parte, en los ovarios XY, el nivel máximo se detectó a los 13 dpp con y sin FSH.

En la figura 6, se muestra que en los ovarios XX y XY cultivados sin FSH hay una disminución en la producción de P4 de los 10 a los 11 dpp, la cual es mayor en el ovario XY y esta disminución se mantiene hasta el día 12 dpp en este tipo de ovario. En el ovario XX se empieza a incrementar la síntesis de P4 a los 11 dpp, mientras que en el ovario XY este proceso se inicia a los 12 dpp. A los 12 dpp, los ovarios XX presentan una caída en la producción de P4 que se mantiene hasta el día 14 dpp, mientras que en los ovarios XY este descenso en la síntesis de P4 se presenta hasta el día 13 dpp. A partir del día 14 dpp, la producción de P4 se incrementó en ambos tipos de ovarios. Asimismo, a

los 10 dpp en los ovarios XX cultivados con FSH, los niveles de P4 se incrementan notablemente. En los ovarios XY, la P4 secretada es la mitad de la detectada en el ovario XX y se mantiene estable del día 10 al 12 dpp. La síntesis de P4 en los ovarios cultivados con FSH empieza a incrementarse a los 12 dpp en ambos tipos de ovarios y mostró tener un importante incremento del día 12 al 14 en los ovarios XX mientras que en los ovarios XY la síntesis de P4 detectada en el día 13 dpp fue 3 veces mayor. La producción de este metabolito disminuye del día 14-16 en los ovarios XX mientras que esta disminución se inicia desde el día 13 dpp en ovarios XY. Para esta interacción de variables se encontró: $F(5,101)=2.45$; $p<0.0383$.

4.0 Validación del análisis ANOVA

Los siguientes análisis se realizaron para certificar que los resultados obtenidos con la prueba de ANOVA son válidos en función de criterios como homogeneidad de varianzas, análisis de covarianzas y distribución normal dentro de los grupos.

a) Análisis de covarianza

Se realizó un análisis de covarianza dentro de los grupos y se encontró que fue igual a 20.47 con una correlación de 1.0 y la covarianza total fue de 23.71 con una correlación de 1.0; lo que significa que los datos obtenidos con el análisis ANOVA son confiables.

b) Gráfica "Scatter" para la interacción de las variables

Las gráficas "scatter" muestran diferencias de correlación entre variables dependientes en grupos seleccionados por la variable que los agrupa.

Se observó que hay una distribución normal y una correlación positiva en los ovarios cultivados con FSH y sin FSH en las diferentes edades estudiadas y entre los dos sexos principalmente en los ovarios XX con FSH de 12 y 13 dpp y sin FSH de 10 dpp. (Figura 7). Mientras que en los ovarios XY de 11 y 16 dpp cultivados con FSH y los XY de 12 dpp sin FSH también hay una distribución normal y una correlación positiva (Figura 8).

También se observó la distribución normal de las muestras de 11 y 12 dpp de ovarios XY con FSH y sin FSH (Figura 7 y 8).

c) Gráfica de variabilidad

Las gráficas de "Box-Whisker" (Figura 9) permiten comparar la variabilidad de grupos debida a la interacción de las tres variables: hormona, edad y sexo genético. En los ovarios XX con FSH la variabilidad a los 12 y 13 dpp mostró ser pequeña al igual que en los ovarios XY con hormona a los 11 dpp y sin hormona a los 12 dpp; lo que significa que en estos grupos las muestras analizadas tuvieron mucha reproducibilidad. En contraste, los ovarios XX con hormona de 14 dpp mostraron una variabilidad muy grande con respecto a los otros grupos, por lo que las muestras de este grupo son poco representativas.

d) Correlación entre los promedios y las desviaciones estándar

Para validar los estudios se evaluó la correlación entre los promedios y las desviaciones estándar y se encontró que existe una correlación menor a 0.6 por lo que los resultados obtenidos son confiables dado que entre más difiera esta correlación de

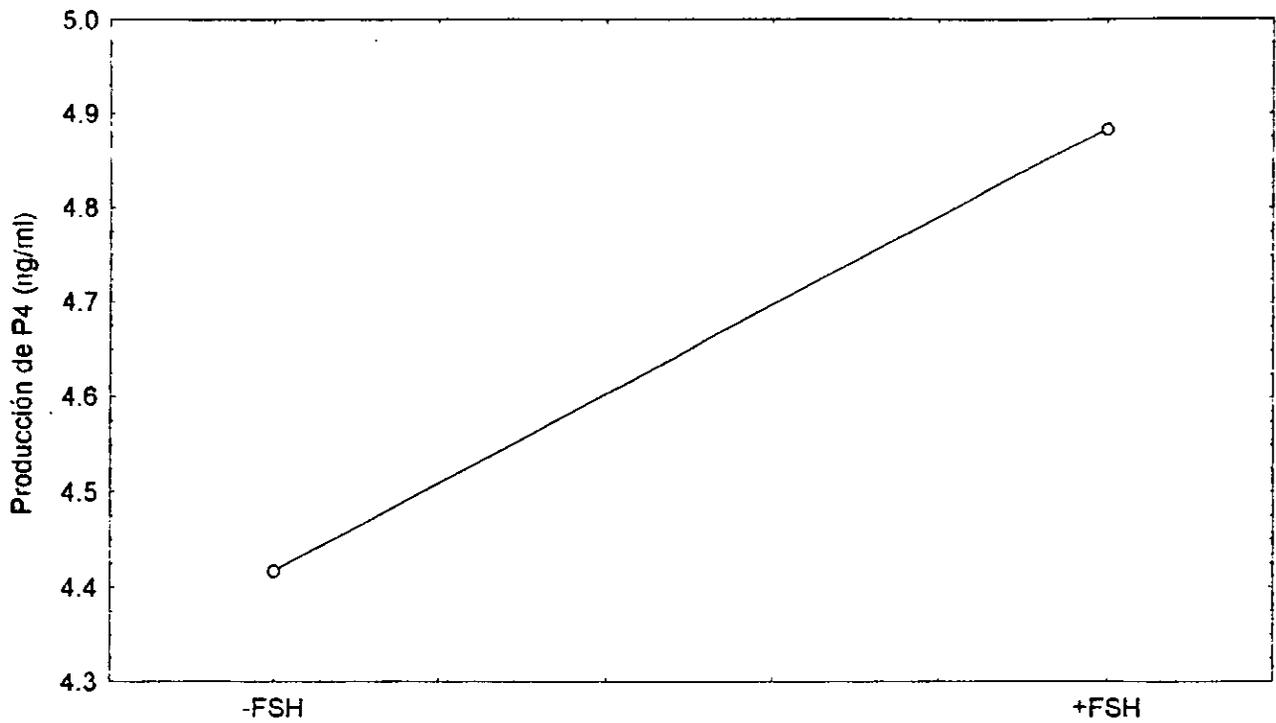


FIGURA 1. Gráfica de los valores de P4 detectados en los ovarios cultivados con y sin FSH

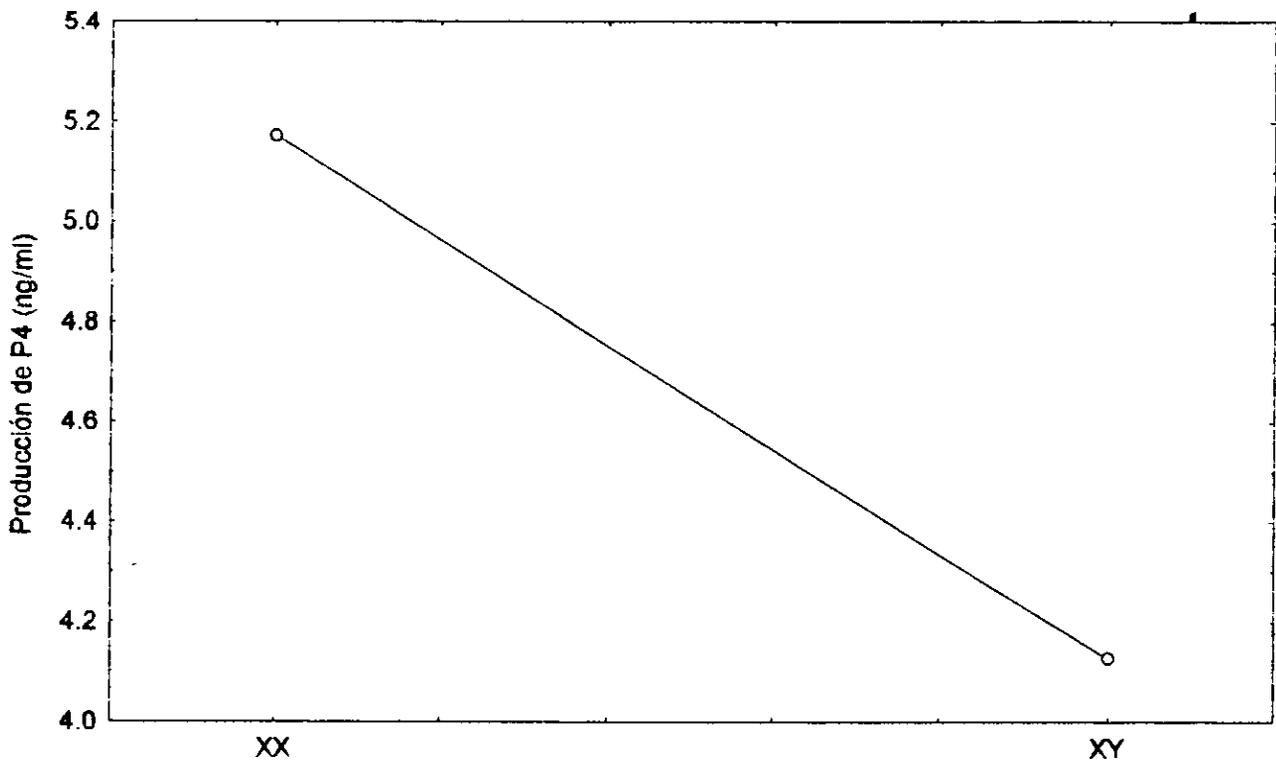


FIGURA 2. Gráfica de los valores de P4 detectados en los ovarios XX y XY

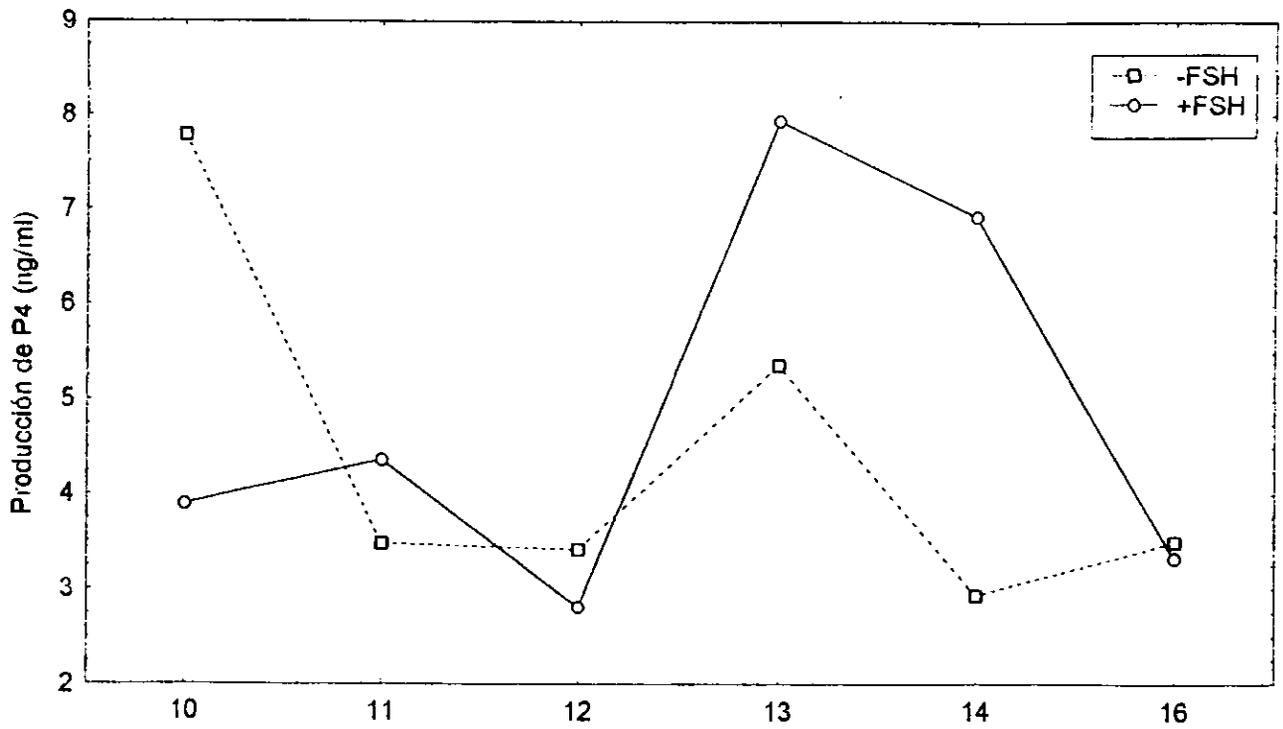


FIGURA 3. Gráfica de los valores de P4 para la interacción de las variables hormona-edad.

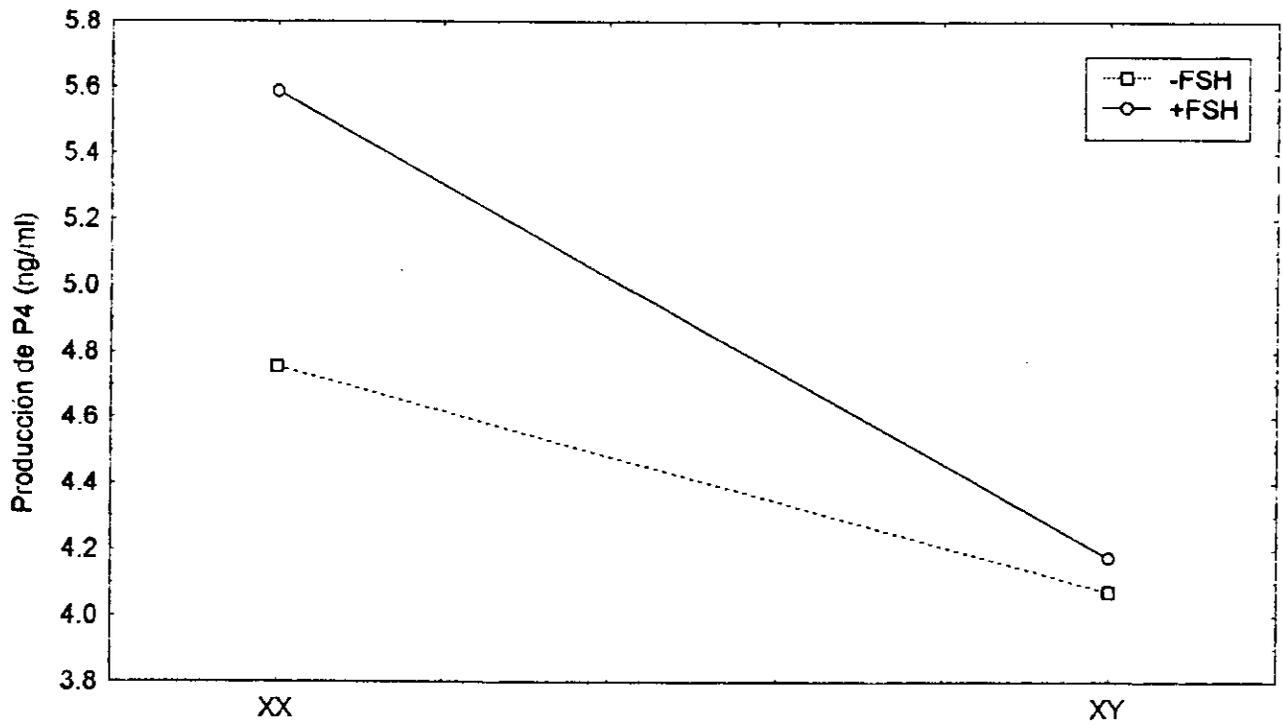


FIGURA 4. Gráfica de valores de P4 para la interacción de las variables hormona-sexo genético.

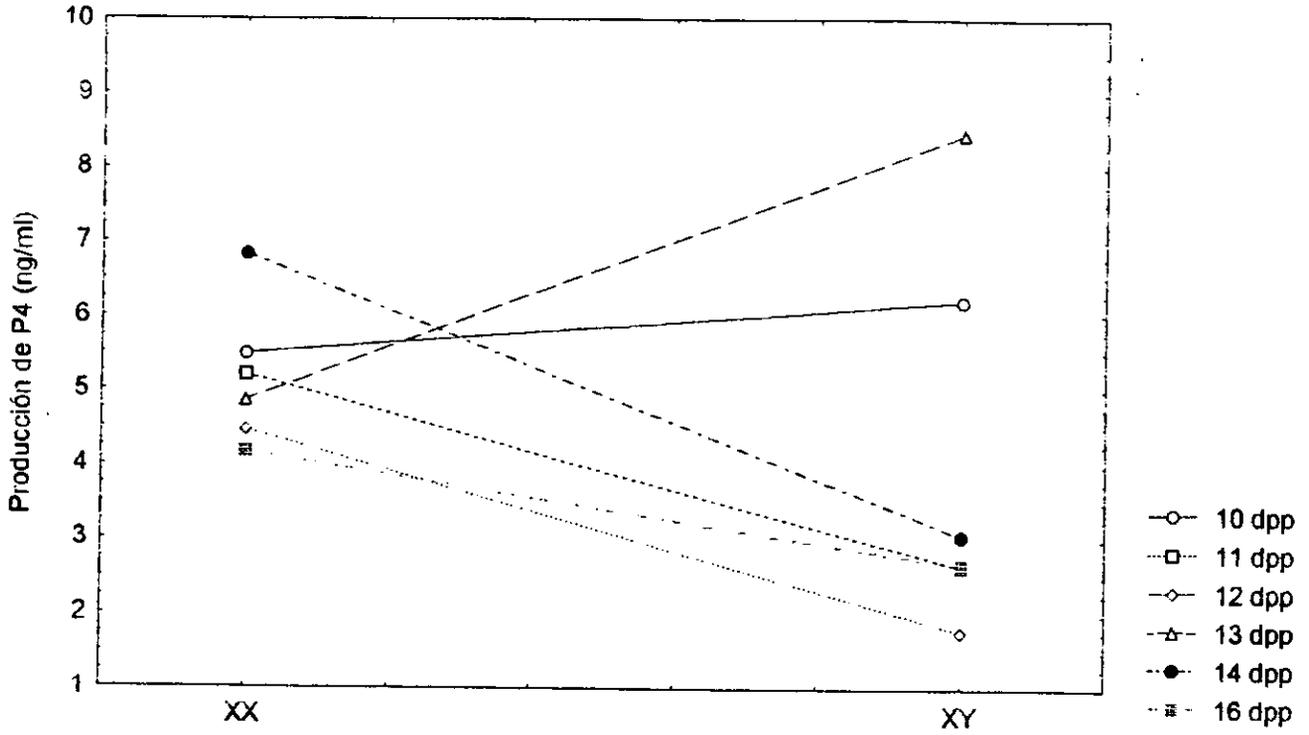


FIGURA 5. Gráfica de valores de P4 para la interacción de variables edad-sexo genético.

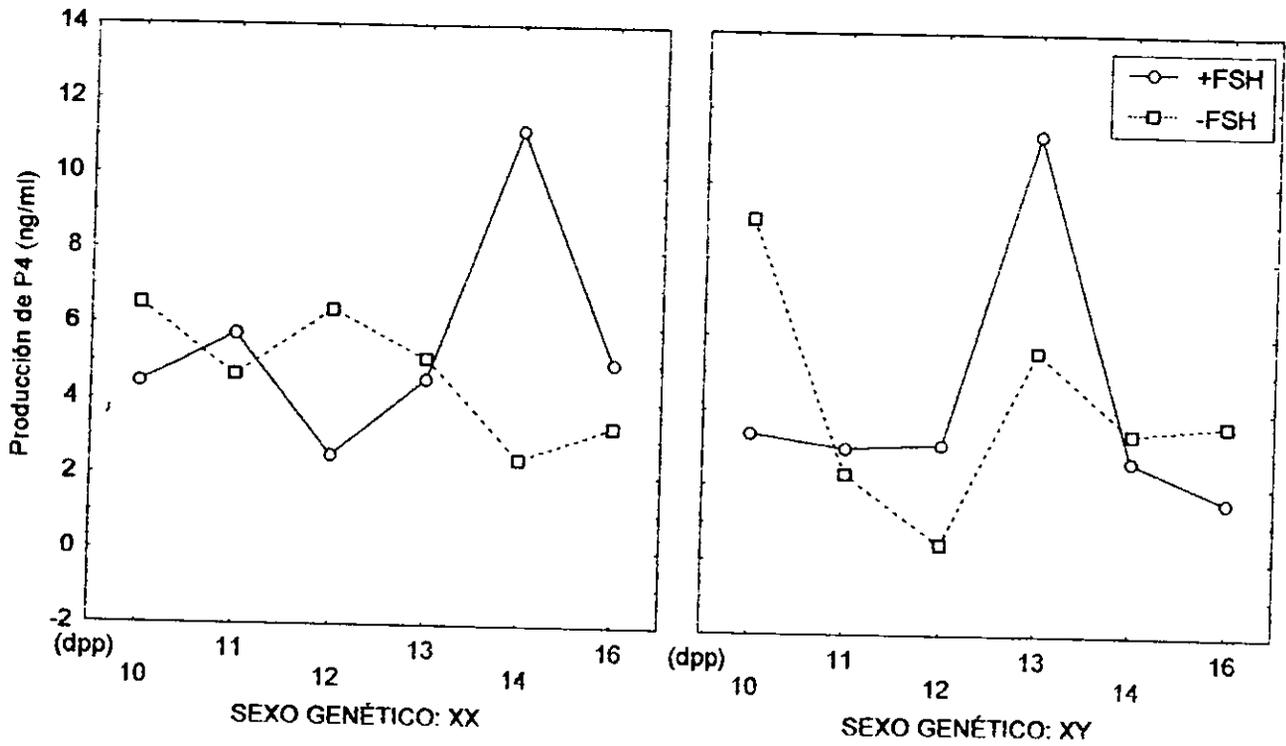


FIGURA 6. Gráfica para la interacción de las variables: hormona, edad y sexo genético.

SEXO GENÉTICO: XX

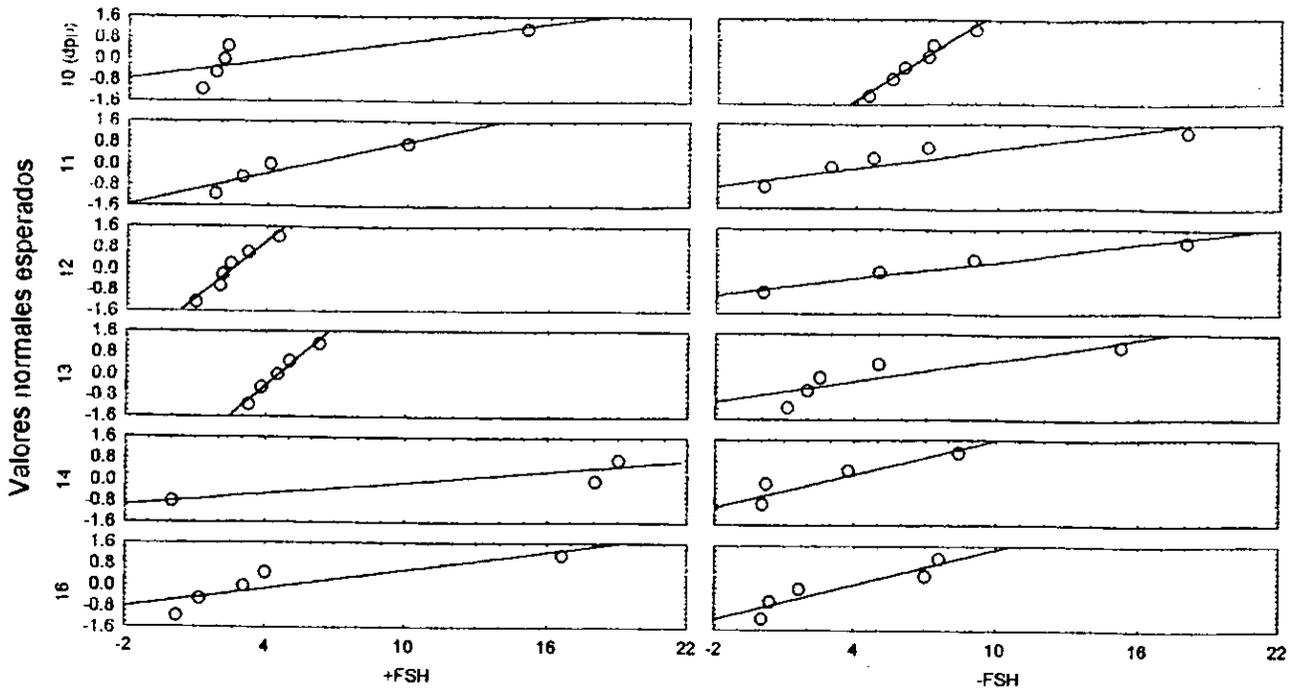


FIGURA 7. Gráfica "Scatter" para la interacción de las variables hormona, edad y sexo genético XX.

SEXO GENÉTICO: XY

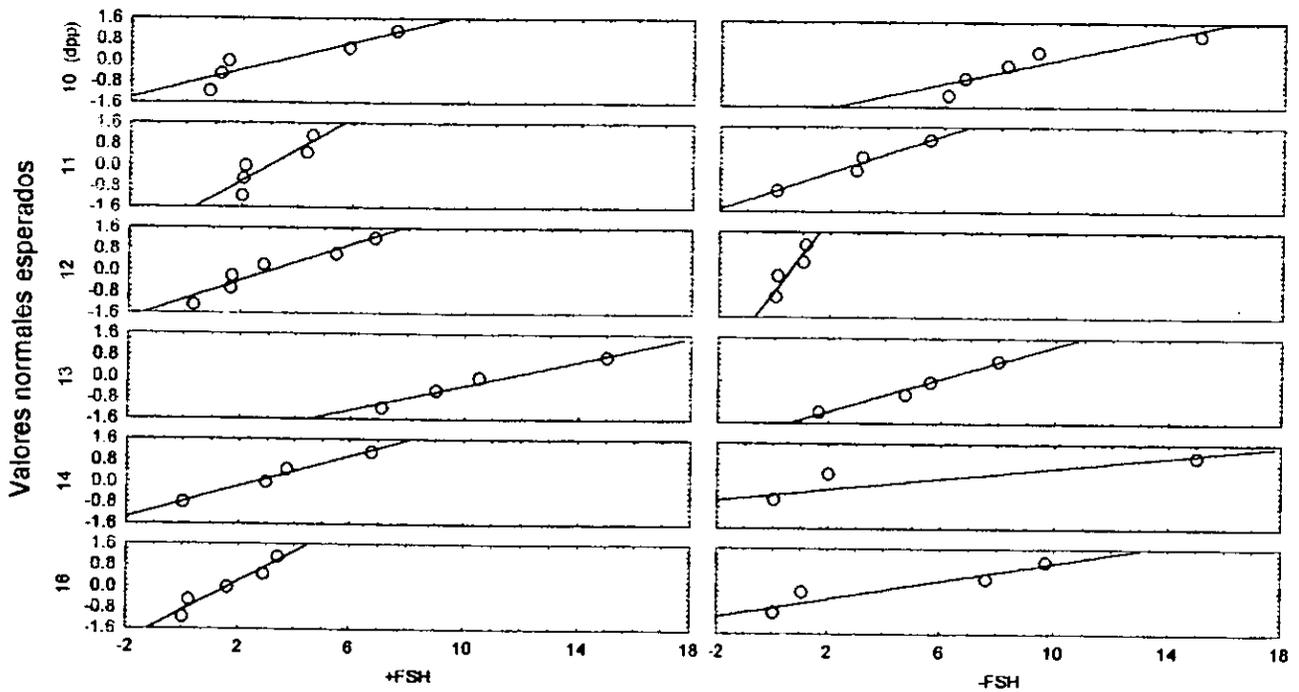


FIGURA 8. Gráfica "Scatter" para la interacción de las variables hormona, edad y sexo genético XY.

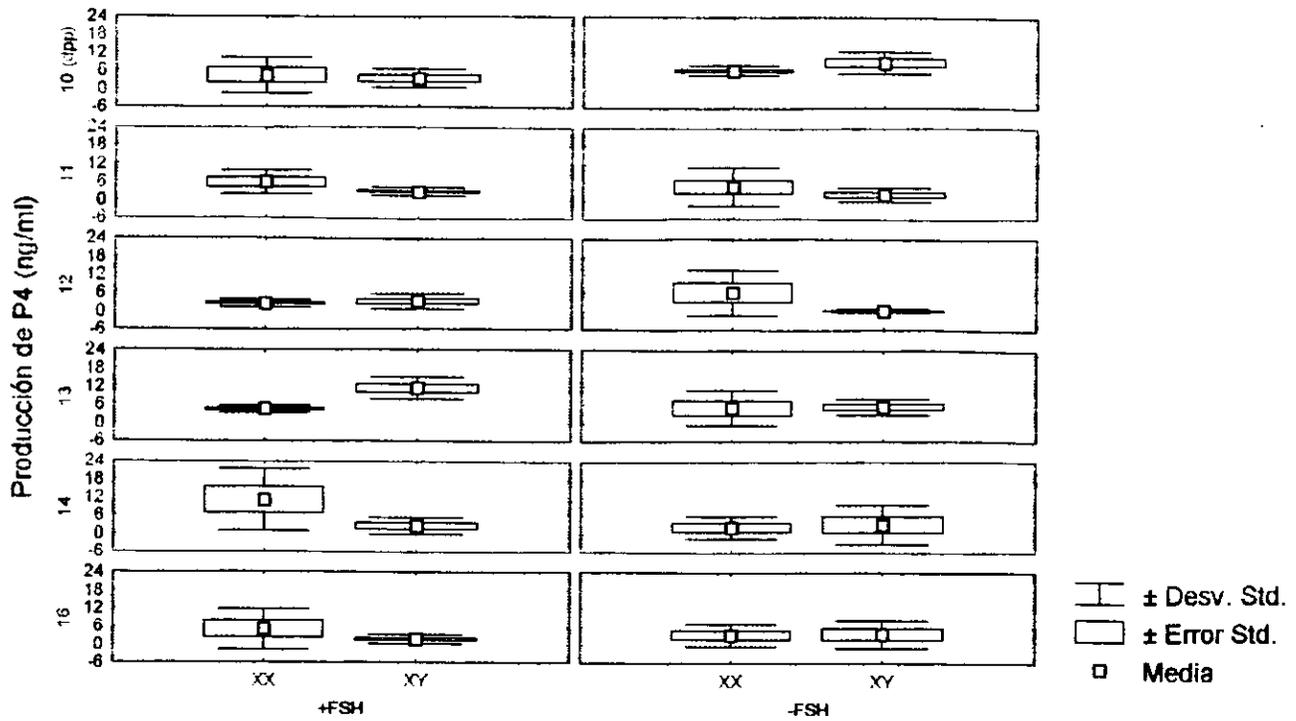


FIGURA 9 . Gráfica "Box-Whisker" para la interacción de las variables hormona, edad y sexo genético.

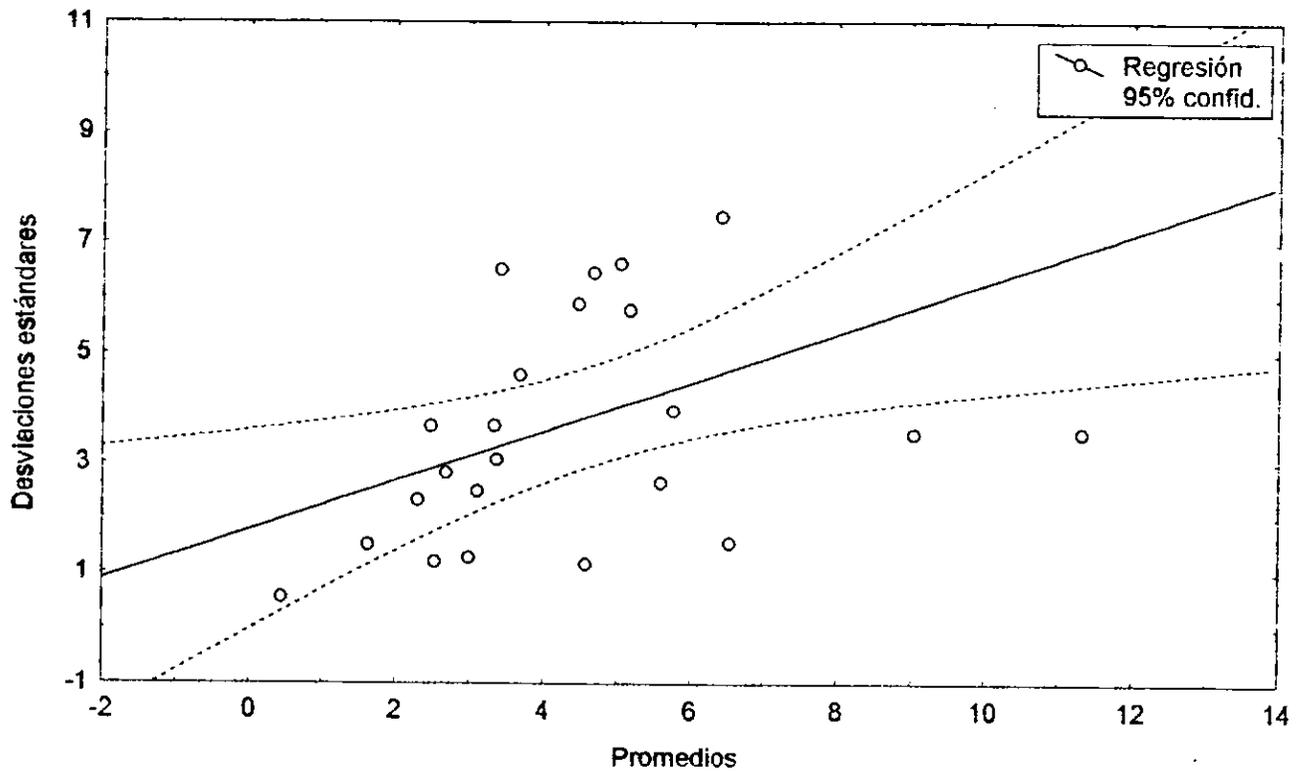


FIGURA 10. Correlación entre los promedios y las desviaciones estándar.

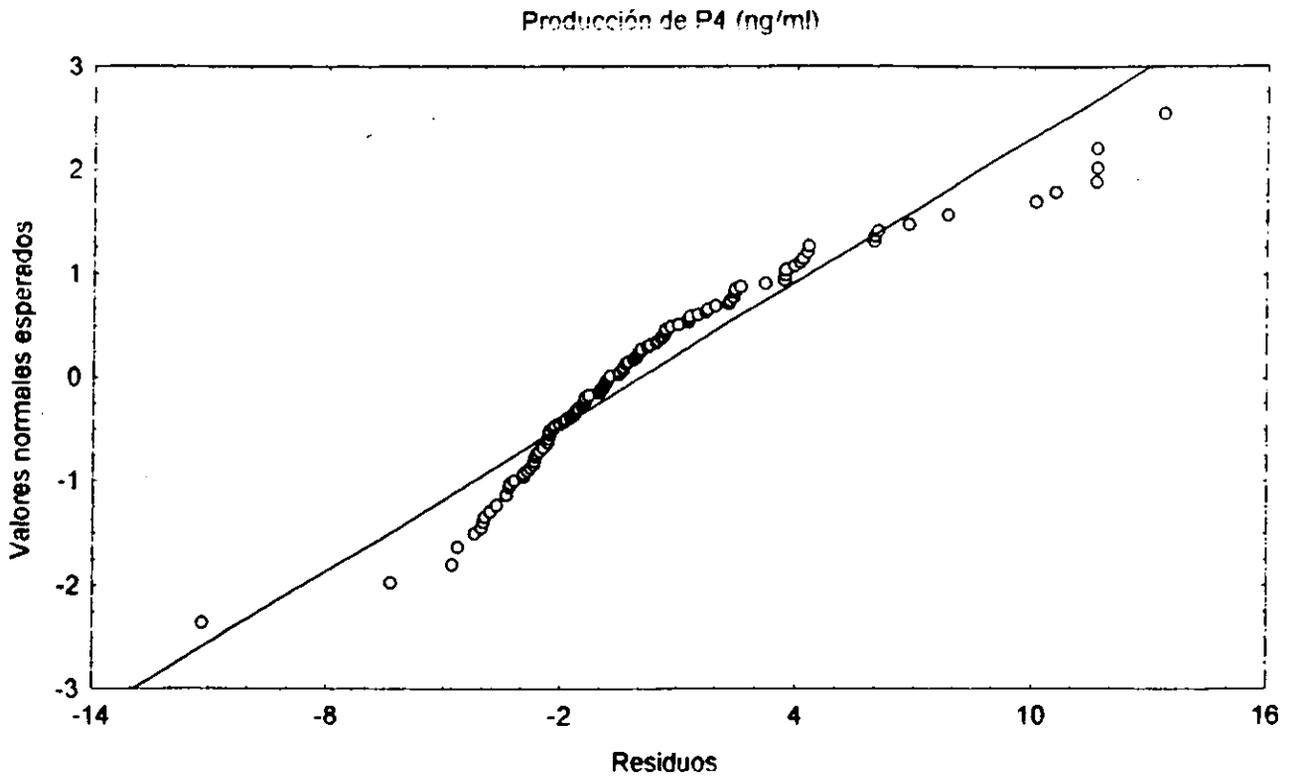


FIGURA 11. Gráfica de la probabilidad normal de residuos.

5.0 Descripción histológica de los ovarios B6.Y^{DOM}

Se observó que los ovarios XX de 10 dpp están constituidos por folículos primordiales mientras que en el ovario XY también se vieron este tipo de folículos. Se observó que los ovarios XX de los 12-16 dpp están constituidos por folículos preantrales (figura 12). En los ovarios XY se observó que la región central está constituida por cordones estériles y los folículos preantrales se están desarrollando en la corteza (figura 13).

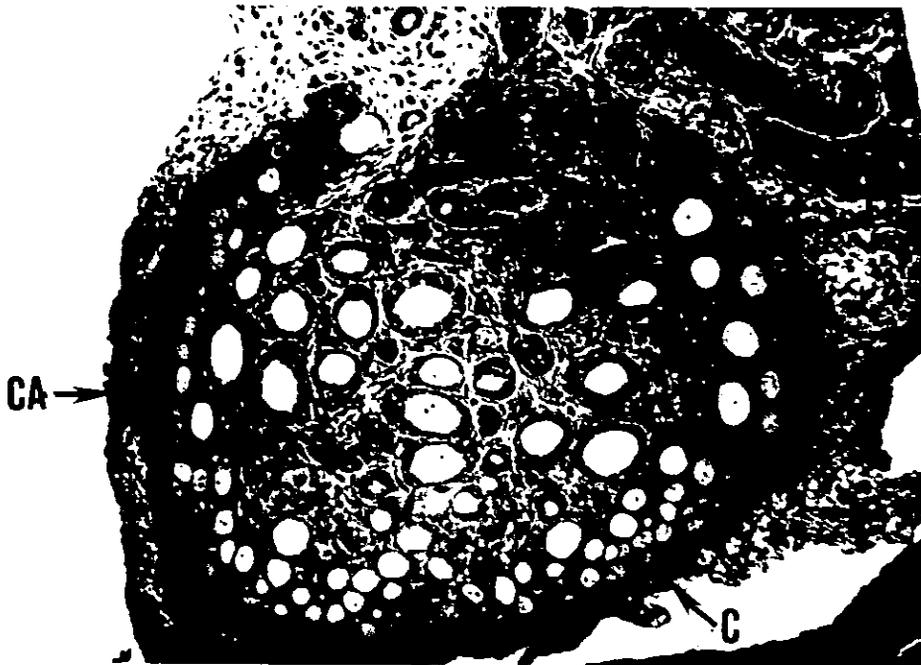


Figura 12. Se muestra un corte transversal de un ovario XX de 12 dpp en el que se aprecian los folículos primordiales (FP) en la corteza (C) y algunos folículos preantrales (cabezas de flecha). Asimismo, se observa la cápsula de tejido conectivo (CA) que envuelve al ovario y un vaso sanguíneo (V), 10X.



Figura 13. Se muestra un corte transversal de un ovario XY de 12 dpp en el que se aprecian los folículos primordiales (FP) en la corteza (C) y los cordones medulares estériles (cabezas de flecha); así como, un vaso sanguíneo (V) y algunas gotas lipídicas localizadas en los cordones ováricos, (10X).

VII. DISCUSIÓN

Durante el desarrollo morfológico del ovario infantil de los mamíferos ocurren cambios bioquímicos y endocrinológicos los cuales son controlados por diversos factores, entre éstos el IGF-I. En el presente estudio, se observó que la producción de P4 fue alta en los ovarios XX cultivados sin FSH de los 11 a los 12 dpp. Los datos encontrados en esta investigación demuestran que la producción de P4 en ambos tipos de ovarios a esta edad depende importantemente de la presencia del IGF-I solo. Estos resultados sugieren que el IGF-I es uno de los reguladores o factores que activan a la enzima 20,22 desmolasa en el ovario. Estos datos apoyan la hipótesis propuesta por Amstrong (1979) quien sugiere que la función endócrina del ovario en la primera semana de vida posnatal es independiente del control de gonadotropinas. Este autor plantea que la esteroidogénesis depende principalmente de los cambios en la expresión y/o actividad de la enzima 20,22 desmolasa más que de la presencia de receptores a gonadotropinas o a la acción de la prostaglandina (E2). Además, en esta fase la producción de P4 es controlada por un pequeño pero importante efecto debido a niveles bajos de AMPc, el cual se asocia a niveles bajos pero detectables de actividad de la 20/22 desmolasa (Fortune y col., 1977).

Algunos estudios han propuesto que los receptores para IGF-I son dependientes de AMPc ya que la administración de análogos no degradables del AMPc favorece la función del IGF-I al aumentar los niveles de este péptido intracelularmente y por consiguiente la producción de P4 (Adashi y col., 1988).

En los mamíferos adultos los niveles de P4 son regulados por la interacción de la LH con su receptor membranal para estimular la esteroidogénesis por la vía del AMP cíclico (Davoren y Hsueh, 1986) y/o la del ácido araquidónico y leucotrienos (Steele y Leung, 1993); así como por la regulación de canales de cloro y calcio (Steele y Leung, 1993). En los ovarios XX a los 14 dpp y XY a los 13 dpp cultivados con IGF-I se podrían activar a segundos mensajeros intracelulares como el AMPc u otros mensajeros, lo cual incrementaría el número de receptores al IGF-I y por tanto los niveles de P4 aumentarían. En estudios realizados previamente se observó que a los 14 dpp, los niveles endógenos

de AMPc detectados en los ovarios XX y XY son similares (Villalpando y col., datos en proceso).

Los niveles elevados de P4 en los ovarios XX a los 14 dpp y a los 13 dpp en el ovario XY podrían deberse a la acción de la LH que se encuentra presente como contaminante en el Folligon (95% de FSH y 5% de LH) en pequeñas cantidades. Esta hormona podría haber estimulado a la 20,22 desmolasa de las células de la teca a producir más P4. Los cambios en la esteroidogénesis en el ovario de los roedores en el período infantil reflejan cambios en la actividad folicular temprana ya que al nacimiento, el ovario del ratón contiene principalmente folículos primordiales y una gran cantidad de tejido estromático dado que de los 12- 13 dpp, los ovarios XX y XY están constituidos por folículos antrales y células de la teca las cuales contienen receptores a LH pero no a FSH (Richards, 1980). Así mismo, los niveles elevados de P4 podrían también deberse a un efecto proliferativo del IGF-I sobre las células de la teca ya que en esta etapa todavía no participa la FSH para incrementar el número de células de la granulosa (Chambers y Studds, 1976). Aunque en esta investigación se analizó la producción de P4 en las células de la teca y de la granulosa del ovario B6Y.^{DOM}

Se observó que en los ovarios XY cultivados con FSH más IGF-I la producción de P4 empieza a disminuir a los 13 dpp. Esta observación está de acuerdo con lo publicado por Villalpando y col. (1993) donde se describe que la adición de PMSG (hormona homóloga a la FSH) en el ovario XY a los 14 dpp, disminuye la producción de P4, aunque en ese estudio anterior no se evaluó el efecto del IGF-I sino sólo el efecto de la FSH.

En el caso de ratones hipogonadales (deficientes en FSH y LH) de 1-30 dpp, la P4 detectada tiene origen principalmente en las células de la teca (Eshkol y Lunnenfold, 1972; Lostroh y Johnson, 1966). En el día 3 dpp, el tejido estromático intersticial disminuye en abundancia y la actividad esteroidogénica desaparece, lo que sugiere que este tejido es el componente esteroidogénico activo a esta edad en ratones hipogonadales (Murphy y O'Shaughnessy, 1991). Entre los días 5 y 7 dpp, ocurre la diferenciación del tejido de la teca y en el día 7 dpp, la LH estimula la síntesis de P4 y androstendiona, sin acción de FSH, de tal forma que la P4 es el metabolito principal a partir, de la cual se

sintetizan los otros esteroides producidos en estos ratones. Es posible que la P4 detectada en los ovarios XY se deba a la participación del compartimento tecal únicamente. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la pérdida de las CGP en el ovario XY produzca una luteinización precoz de las células de la granulosa.

Mannan y O'Shaughnessy (1991) publicaron que no encontraron efecto significativo de FSH en la producción de P4 hasta los 15 dpp en los ratones hipogonadales que es el momento en que los folículos antrales predominan en el ovario.

En la presente investigación se corroboró que el IGF-I interactúa con la FSH en los ovarios XX a los 11, 14 y 16 dpp y en los ovarios XY de los 11 a los 13 dpp de manera sinérgica incrementando la producción de P4 en el ratón de manera similar a lo observado en otras especies (Baranao y Hammond, 1984; Wood y col., 1994; Hsu y Hammond, 1987). En el ovario XY, el nivel máximo de P4 fue a los 13 dpp y fue tres veces mayor. Las pruebas estadísticas, así como las observaciones bioquímicas realizadas a los 13 y 14 dpp sugieren que importantes cambios funcionales se llevan a cabo en estas edades. Sin embargo, queda por investigar el mecanismo a través del cual este proceso ocurre. El IGF-I posee varias funciones modulatorias, ya que se ha visto que en presencia de FSH, uno de los efectos de éste sobre las células de la granulosa de rata cultivadas en ausencia de suero, es aumentar la producción de progesterona y 20- α -dihidroprogesterona 10 y 4 veces respectivamente (Adashi y col., 1984 y 1985a); lo cual indica que el IGF-I juega un papel importante en la diferenciación esteroidogénica de las células de la granulosa y el desarrollo folicular. Los ovarios XX cultivados con FSH empiezan a incrementar los niveles de P4 dos días antes que los XY cultivados con FSH. Las diferencias en la producción de P4 en ambos tipos de ovarios podría ser debidas a que la ausencia de CGP en los cordones medulares estériles podría haber inducido una activación tardía de la enzima 20,22 desmolasa en las células de la granulosa del ovario XY.

Los ovarios XX y XY tienen un desarrollo similar en las etapas iniciales de formación de la gónada. Sin embargo, a los 16 dg. los ovarios XY empiezan a perder las células progenitoras de los gametos de la región medular, en el momento en el que la

mayoría de las CGP están en el cigoteno o paquiteno de la profase I dejando en esta zona cordones sexuales estériles constituidos en su interior por células epiteliales (precursoras de la granulosa y células de la teca) alrededor de los cordones y en el intersticio (Taketo y col., 1989; Villalpando y col., 1996).

La producción de P4 a lo largo de los diferentes estadios del desarrollo del ovario del ratón B6Y.^{DOM}, detectada en la presente investigación, podría explicarse considerando que las células involucradas en la esteroidogénesis gonadal de este ratón son de dos tipos básicos: (a) células con probable respuesta a LH excepto a los 12 dpp, como las de la teca y las células intersticiales del estroma, localizadas por fuera de los cordones estériles en las cuales existen receptores a LH y también (b) las células de la granulosa, algunas de las cuales podrían leutinizarse precozmente debido a la atresia folicular que inicia en la fase embrionaria y que se lleva a cabo durante toda la corta vida reproductiva de estos ratones.

El IGF-I podría aumentar los índices de progesterona en las células del ovario al activar cuatro mecanismos complementarios: estimulando y utilizando las lipoproteínas de alta densidad, como proveedoras de esteroides (LDL y HDL); aumentando la síntesis *de novo* de colesterol; facilitando la remoción de ésteres de colesterol y al incrementar la división lateral de colesterol y estimular la síntesis de progesteronas (Maggofin y Erickson, 1993; Hernandez y col., 1988).

Por otra parte, existen diferencias específicas de especie en la expresión y síntesis del IGF-I ya que en el ratón, el IGF-I se produce en las células de la teca (Villalpando y col., 1996) a diferencia de lo observado en la rata y en otras especies de mamíferos en donde se localiza en las células de la granulosa (Veldhuis y col., 1985; Zoller y Weisz, 1978). Aunque no se ha estudiado cual es el sitio de síntesis del RNAm del IGF-I en el ratón, se sabe que este puede funcionar como factor autócrino y/o parácrino en otras especies. La expresión del ARNm del IGF-I en el ovario XY, empieza a los 15 dpp (Villalpando y col., 1997) es decir quince días después que el ovario XX, esto podría estar afectando la regulación autócrina/parácrina de las células de la teca y/o granulosa, lo cual podría explicar parcialmente la baja producción de P4 a los 13 dpp en el ovario XY. Sin

embargo, la síntesis de P4 empieza a aumentar del día 14 dpp en adelante, en ambos tipos de ovarios (datos no mostrados).

En este estudio se observó que el IGF-I actúa como inhibidor de la producción de P4 en varias etapas del desarrollo estudiadas. Es posible que el IGF-I tenga también un efecto inhibitorio al interaccionar con otros factores que desconocemos. Sin embargo, no se debe descartar la posibilidad de que los niveles de P4 detectados en esta investigación en los ovarios XX y XY sean el reflejo de la interacción del IGF-I con su receptor. Se sabe que el IGF-I tiene un efecto inhibitorio en la síntesis de estrógenos en las células de Sertoli en el testículo de rata (Rappaport y Smith, 1996); pero en ovario, el presente estudio es el primero en el que se observa un efecto inhibitorio del IGF-I.

En los ovarios XY no sabemos si las células de la médula del ovario XY son todas o sólo algunas XY o XX, de tal manera que si el *Sry* se expresa tardíamente y si hay una expresión anormal de la 20,22 desmolasa en el ovario XY esto se reflejaría en un retraso o adelanto en la síntesis de P4 antes de que empiece la producción de este metabolito en el ovario XX (control). Asimismo, la función de la enzima 20,22 desmolasa podría estar regulada por productos secretados por genes autosómicos dominantes presentes en la cepa *Mus musculus domesticus* que están desfasados de manera espacio-temporal con los de la cepa B6. En estudios previos se ha planteado que el gene *Sry* se expresa en cierto momento durante el desarrollo del ovario en el ratón B6Y.^{DOM}, lo cual podría interrumpir el establecimiento de las funciones normales endócrinas (Chung- Hae y Taketo, 1994).

La baja en la producción de P4 que no es mediada por gonadotropinas de los 10 a los 11 dpp y de los 13 a los 14 dpp en ambos tipos de ovarios podría deberse a otros factores como la regulación negativa en la expresión de la 20,22 desmolasa y la utilización de la P4 para la síntesis de andrógenos entre otros. Cabe aclarar que a los 12 dpp en el ovario XY este no parece ser el caso debido a que los andrógenos podrían ser convertidos en otros metabolitos que desconocemos.

Recientemente se publicó que el número de receptores a gonadotropinas es igual en el ovario XX y XY de manera que es posible que el mecanismo de regulación de la esteroidogénesis en el ovario XY este interrumpido en su vía normal a otro nivel que

podría ser el de las proteínas cinasas (Amleh y col., 1996). Asimismo, es posible que los esteroides ováricos medien sus efectos a través de la síntesis de otros reguladores intragonadales desconocidos hasta el presente. Para validar aún más el presente estudio dado que la varianza de las muestras es muy grande sería conveniente incrementar el número de ovarios de XX y XY para tener una idea más exacta sobre la producción de P4 en estos ratones.

En conclusión el IGF-I parece tener un efecto dual como inhibidor y estimulador de la síntesis de progesterona en los ovarios infantiles XX y XY en el ratón B6Y.^{DOM}, lo cual podría afectar la producción de progesterona y testosterona que se sintetiza durante el desarrollo folicular temprano. La alteración en la síntesis de cualquiera de estos esteroides influenciaría de manera negativa algunos aspectos reproductivos en el ratón B6Y.^{DOM} provocando que tenga un ciclo estral irregular y que desarrolle problemas de esterilidad.

VIII. CONCLUSIONES

1. El IGF-I sólo incrementa la producción de P4 únicamente en algunos días del desarrollo folicular temprano en los ovarios XX y XY.

2. El IGF-I tiene una acción sinérgica con la FSH en los ovarios XX y XY de los ratones B6Y.^{DOM}.

3. La acción sinérgica de la FSH en la producción de P4 está retardada 24 horas en el ovario XY con respecto al ovario XX.

4. El IGF-I tiene un efecto inhibitorio de los 10 a los 11 dpp y de los 12 a los 14 dpp en los ovarios XX. En el ovario XY este efecto se presenta de los 10 a los 12 dpp y de los 13 a los 16 dpp.

El IGF-I controla la producción de esteroides durante el desarrollo folicular temprano y aparentemente tiene un efecto dual como inhibidor y estimulador de la síntesis de P4 en el ovario prepúber XX y XY de la cepa del ratón B6Y.^{DOM}. Este efecto dual podría estar relacionado con el tipo de folículos que sobrevivan en este período en el ovario de las hembras XY.

IX. REFERENCIAS

1. -Adashi, E. Resnick, E., Svoboda, M. and Van Wyk, J. (1984) A novel role for somatomedin-C in the cytodifferentiation of the ovarian granulosa cell. *Endocrinology* 115:12227-12229.
2. -Adashi, E. Resnick, E., Svoboda, M. and Van Wyk, J. (1985a) Somatomedin-C synergics with follicle stimulating hormone in the adquisition of progesterone biosynthetic capacity by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 116:2135-2142.
3. -Adashi, E. Resnick, E., Svoboda, M. and Van Wyk, J. (1985b) Somatomedin-C mediating potentiation of follicle-stimulating hormone induced aromatase activity of cultered rat granulosa cells. *Endocrinology* 117:2313-2320.
4. -Adashi, E. Resnick, E., Svoboda, M. and Van Wyk, J. (1986a) Follicle-stimulating hormone enhances somatomedin-C binding to cultured rat granulosa cells; evidence for cAMP dependence. *J. Biol. Chem.* 261:3923.
5. -Adashi, E. Resnick, E., Svoboda, M. and Van Wyk, J. (1986b) Somatomedin-C an amplifier of follicle stimulating hormone action; enhanced accumulation of 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 118:149.
6. -Adashi, E. Resnick, E., Svoboda, M. and Van Wyk, J. (1988) Characterization and regulation of a specific cell membrane receptor for somatomedin-C/insuline like growth factor I in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 122:194-201.
7. -Adashi, E. Resnick, E., Svoboda, M. and Van Wyk, J. (1989) Rodent studies on the potential relevance of insuline-like growth factor (IGF-I) to ovarian physiology. In: *Growth factors and the ovary*. Anne N. Hirshfield (ed.) Plenum Press, Nueva York.
8. -Amleh, A., Ledee, N., Saeed, J. and Taketo, T. (1996) Competence of oocytes from the B6Y.^{DOM} sex-reversed female mouse for maturation, fertilization and embryonic development *in vitro*. *Develop. Biol.* 178: 263-275.
9. -Amsterdam, A., Koch, Y., Lieberman, M. and Lidner, H. (1975) Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *J. Cell. Biol.* 67: 894-900.

- 10.-Armstrong, D. and Papkoff, H. (1976) Stimulation of aromatization of exogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rats in vivo by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 99:1144-1151.
- 11.-Armstrong, D. (1979) Alterations of progesterone metabolism in immature rat ovaries by luteinizing hormone. *Biol. Reprod.* 21:1025- 1033.
- 12.-Austin, C. and Short, R. (1982a) El hipotálamo. En: *Procesos de reproducción en los mamíferos*. Ediciones científicas. La Prensa Médica Mexicana S. A. pp. 28-71.
- 13.-Austin, C. and Short, R. (1982b) Ovogénesis y ovulación. En: *Procesos de reproducción en los mamíferos*. Ediciones científicas. La Prensa Médica Mexicana S. A. pp. 15-27.
- 14.-Baranao, J. and Hammond, J. (1984) Comparative effects of insulin and insulin-like growth factors on DNA synthesis and differentiation of porcine granulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124:484-490.
- 15.-Berta, P., Hawkins, J. R., Sinclair, A. H., Taylor, A., Griffiths, B. L., Goodfellow, P.N. and Fellow, M. (1990) Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348:448-450.
- 16.-Behringer, R., Cate, R., Froelick, G., Palmiter, R., Brinster, R. (1990) Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing Mullerian inhibiting substance. *Nature* 345:167-170.
- 17.-Brambell, F. (1927) The development and morphology of the gonads of the mouse. Part I. The morphogenesis of the indifferent gonad and of the ovary. *Proc. R. Soc. London. Ser. B.* 101:391-409.
- 18.-Brewer, M., Stetter, G. and Squire, C. (1988) Cloning, characterization and expression of a human insulin-like growth factor binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 152: 1289-1297.
- 19.-Byskov, A. G. (1974). Does the rete ovarii act as a trigger for the onset of meiosis?. *Nature.* 252:396-397.
- 20.-Byskov, A. G., Grinsted J. (1981). Feminizing effect of mesonephros on cultured differentiating mouse gonads and ducts. *Science* 212:817-818.

- 21.-Byskov, A. G., Lintern-Moores (1973) Follicle formation in the immature mouse ovary: The role of rete ovarii. *J. Anat.* 116:207-217.
- 22.-Cassandra, X., Constantino, P., Landis, P. and Kostyo, J. (1991) Insuline-like growth factor-I stimulates steroidogenesis in rabbit luteal cells. *Endocrinology* 128:1702-1708.
- 23.-Clemmons, D., Thissen, J. and Maes, M. (1989) Insuline-like growth factor-I (IGF-I) infusion into hypophysectomied or protein deprived rats induces specific IGF binding proteins in serum. *Endocrinology* 125:2967-2972.
- 24.-Cook, B., Choi, M., Dirami, G., Lopez-Ruiz, M. and West, A. (1992) Control of steroidogenesis in Leydig Cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 43:445-449.
- 25.-Cooke, H. J. (1976) Repeated sequences specific to human males. *Nature.* 262:182-186.
- 26.-Chambers, D. and Studds, J. (1976) Cyclic nucleotide proteins detected by photoaffinity labeling in S49 lymphocyte cells. In: *Proceedings of the Tenth International Congress of Biochemistry. Hamburg, Abstr.* 11-1-414.
- 27.-Chang, S., Jones, J. Ellefson, R. and Ryan, R. (1976) The porcine ovarian follicle I. Selected chemical analysis of follicular fluid at different developmental stages. *Biol. Reprod.* 15:321-328.
- 28.-Channing, C. and Seymour, J. (1970) Effects of dibutyl dyclic 3',5'-AMP and other agents upon luteinization of porcine granulosa cells in culture. *Endocrinology* 87:165-169.
- 29.-Chung- Hae, L. and Taketo, T. (1994) Normal onset, but prolonged expression, of Sry gene in the B6Y. DOM sex-reversed mouse gonad. *Dev Biol* 165:442-452.
- 30.-Daughaday, W. and Rotwein, P. (1989) Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocrine Rev.* 10:68-91.
- 31.-Davoren, J. and Hsueh, A. (1984) Insulin enhances FSH-stimulated steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 35:97.

- 32.-Davoren, J. and Hsueh, A. (1985) Somatomedin-C augments FSH-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Am. J. Physiol.* 249:E26.
- 33.-Davoren, J. and Hsueh, A. (1986) Specific insulin-like growth factor (IGF) I and II-binding sites on rat granulosa cells: relation to IGF action. *Endocrinology* 119:2155-2162.
- 34.-Doisy, E., Veler, C. and Thayer S. (1929) Folliculin from urine of pregnant women. *Am. J. Physiol.* 90:329-330.
- 35.-Donahoe, P., Budzik, G., Trelstad, R., Mudgett-Hunter, M., Fuller, A., Hutson, J., Ikawa, H., Hayashi, A. and MacLaughlin, D. (1982) Mullerian inhibiting substance: A update. *Rec. Prog. Horm. Res.* 38:279-330.
- 36.-Dorrington, J., Moon, Y. and Armstrong, D. (1975) Estradiol-17 beta biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 97:1328-1331.
- 37.-Eicher, E. and Washburn, L. (1986) Genetic control of primary sex determination in mice. *Ann. Rev. Genet.* 20:327-360.
- 38.-Eicher, E. and Washburn, L. (1983) Inherited sex reversal in mice: Identification of a new primary sex-determining gene. *J. Exp. Zool.* 228:297-304.
- 39.-Eicher, E. M., Beamer W. G., Washburn L. L., Whitten W. K. (1980) A cytogenetic investigation of inherited true hermaphroditism in BALB/cWt mice. *Cytogenet. Cell Genet.* 28:104-115.
- 40.-Eicher, E.M., Phillips, S.J. Washburn, L.L. (1983). The use of molecular probes and chromosomal rearrangements to partition the mouse Y chromosome into functional region. In *Recombinant DNA and Medical Genetic.* ed. A. Messer, I.,H., Porter. pp. 57-71. New York: Academic Press.
- 41.-Eicher, E.M., Washburn, L.L., Whitney, J.B., III. Morrow. K.E. (1982). *Mus Poschiavinus* Y chromosome in the C57BL/6J murine genome causes sex reversal. *Science* 217:535-37.

- 42.-Erickson, G., Magoffin, D., Dyer, C. and Hofeditz C. (1989) The ovarian androgen producing cells: A review of structure and function relationships. *Endocr. Rev.* 6:371-399.
- 43.-Eshkol, A. and Lunenfold, B: (1972) Gonadotropic regulation of ovarian development in mice during infancy. In: *Gonadotropins*. Saxena, B., Beling, C. and Gandy, H. (eds). Wiley, New York pp.335-346.
- 44.-Fletcher, P., Kaltenbach, C. and Haley, B. (1976) Photoaffinity labeling of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate binding sites in ovine corporea lutea. In: *Nineth Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction*. Abstr. 40.
- 45.-Fortune, J. and Armstrong, D. (1977) Androgen production by theca and granulosa isolated from preestrus rat follicles. *Endocrinology* 100:1341-1347.
- 46.-Ganong, F. (1988) Hipofisis En: *Fisiologia Medica*. El Manual Moderno S.A. de C.V. (ed). México D.F. pp. 341-353.
- 47.-Gondos B. (1984) Germ cell differentiation and intercellular bridges. En: *Ultrastructure of Reproduction*. Editions Van Baerkomon J. and Motta P. Martinus Nijhoff Publisher, Boston. pp. 31-45.
- 48.-Goodman, A. and Hodgen, G. (1983) The ovarian tread of the primate menstrual cycle. *Recent Prog. Horm. Res.* 39:1-73.
- 49.-Gore-Langton and Armnstrong, T. (1988) Follicular steroidogenesis and its reproduction. E. Knobilys; J. Nell et al (ed). Raven Press Ltd, New York. pp. 331-338.
- 50.-Gwynne, J. and Strauss III J. (1982) The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr. Rev.* 5:299-329.
- 51.-Gubbay, J., Collinon J., Koopman P., Capel B., Economou A., Munsterberg A., Vivian N., Goodfellow P. and Lovell-Badge R. (1990) A gene mapping to the sex determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of the embryonically expressed genes. *Nature* 346:245-250.
- 52.-Guraya S. (1973) Interstitial gland tissue of mammal ovary: *Acta. Endocrinol.* 171:5-27.

- 53.-Hernandez, E., Resnick, C., Svodova, M., Van Wyk, J., Payne, D., Adashi, E. (1988) Somatomedin-C/insulin-like growth factor I as enhancer of androgen biosynthesis by cultured rat ovarian cells. *Endocrinology* 122:1603-22.
- 54.-Horbes, T. (1942) On the fate of medullary cords of the human ovary. *Contr. Embryol.* 30: 11-15.
- 55.-Hillier, S., Zelesnik, A. and Ross, G. (1978) Independence of steroidogenic capacity and luteinizing hormone receptor induction of developing granulosa cells. *Endocrinology.* 102:1458-1465.
- 56.-Hsu, C., Hammond, J. (1987) Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by porcine granulosa cells *in vitro*. *Endocrinology* 120:198-207.
- 57.-Hsueh, A., Dufan, M. and Catt, K. (1977) Gonadotropin-induced regulation of luteinizing hormone receptors and desensitization of testicular 3'5'cyclic AMP and testosterone responses. *Cell. Biol.* 74:592-598.
- 58.-Ireland, J. and Richards, S. (1978) A previously undescribed role for leuteinizing hormone (LH:hCG) on follicular cell differentiation. *Endocrinology.* 102:1458-1465.
- 59.-Ireland, J. (1987) Control of follicular growth and development. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 34:39-54.
- 60.-Issgaard, J. Nilsson, A. Vikman, K. and Isakkson, O. (1989) Growth regulates the level of insulin-like growth factor-I mRNA in rat skeletal muscle. *J. Endocrinology* 120:107.
- 61.-Ishwar, S. Sankaranarayanan, A. (1987) Neurogenic involvement in follicular development and ovulation-A probability. *Int. J. Fertil.* 32:388-393.
- 62.-Ivell, R., Hunt, N., Hardy, M., Nicholson, H. and Pickering, B. (1992) Vasopresin biosynthesis in rodent Leydig cells. *Molec. and Cell Endocrin.* 89:59-66.
- 63.-Jones, P. and Hsueh, A. (1982) Pregnenolone biosynthesis by cultured granulosa cells: modulation by follicle stimulating hormone and gonadotrophin releasing hormone. *Endocrinology* 111: 713-721.

- 64.-Karnovsky J.A. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 27:137A.
- 65.-Kellie, A. (1984) Structure and nomenclature. In: *Biochemistry of steroid hormones*. Makin, H. (ed). Blackwell Scientific, Oxford, J. pp. 1-19.
- 66.-Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P. and Lovell-Badge, R. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351: 117-121.
- 67.-Lostro, A. and Johnson, R. (1966) Amounts of interstitial cell-stimulating hormone follicle-stimulating hormone required for follicular development, uterine growth and ovulation in the hypophysectomized rat. *Endocrinology*. 79:991-996.
- 68.-Lee, G. H. and Takedo T. (1994) Normal onset but prolonged expression of Sry gene in the B6Y.^{DOM} sex-reversed mouse gonad. *Dev. Biol.* 165:442-452.
- 69.-Li, X., Juorio, A. and Murphy, B. (1993) Prostaglandins alter the abundance of messenger ribonucleic acid for steroidogenic enzymes in cultured porcine granulosa cells. *Biology of Reproduction* 48:1360-1366.
- 70.-Lidner, H., Tsafiriri, A., Lieberman, M., Zor, V. Koch, Y., Bauminger, S. and Barnes, A. (1974). Gonadotropic action on cultured graafian follicles: Induction of maturation division of the mammalian oocyte and differentiation of the luteal cell. *Rec. Prog. Horm. Res.* 30:79-126.
- 71.-MacCorquodale, D. Thayer, S. and Doig, E. (1936) The isolation of the principal estrogenic substance of liquor folliculi. *J. Biol. Chem.* 115:435-448.
- 72.-Makris, A. and Ryan, K. (1977) Aromatase activity of isolated and recombined hamster granulosa and theca cells. *Steroids* 29:65-72.
- 73.-Mannan, M. and O'Shaughnessy, P. (1988) Ovarian steroid metabolism during postnatal development in the normal mouse and in the hypogonadal (hpg) mouse. *J. Reprod. and Fertil.* 82:727-734.
- 74.-Mannan, M. and O'Shaughnessy, P. (1991) Steroidogenesis during postnatal development in the mouse ovary. *J. Endocrinol.* 130:101-106.

- 75.-Magoffin, D., Erickson G. (1988) An improved method for primary culture of ovarian androgen producing cells in serum free medium: effect of lipoproteins, insulin and insulin-like growth factor-I. *In Vitro Cell Dev Biol.* 122:1603-22.
- 76.-Magoffin, D., Erickson G. (1993) Insulin-like growth factor-I and transforming growth factor- β regulate the differentiation of purified ovarian theca-interstitial cells in serum-free medium. In: *The ovary.* de. Adashi E. and Leung P. Raven Press, Ltd. New York.
- 77.-Magoffin, D., Erickson G. (1982) Primary culture differentiating ovarian androgen-producing cells in defined medium. *J Biol Chem.* 257:4507-13.
- 78.-Magoffin, D., Erickson G. (1988) Purification of ovarian theca interstitial cells by density gradient centrifugation. *Endocrinology.* 122:2345-7.
- 79.-Magre S., Angelopoulou, A and Jost, A. (1980) Cellules de Sertoli en organogénese du testicule foetal. *Ann. Endocrinologie (Paris)* 41:531-537.
- 80.-Mendelson, C., Durham, C., Evans, C. and Simpson, E. (1985) The induction of aromatase activity in estrogen-producing cells is mediated by the increased synthesis of aromatase cytochrome P-450. 67th. Annual Meeting of the Endocrine Society p.77 (Abstr. 307).
- 81.-Merchant-Larios, H. (1976). The role of germ cells in the morphogenesis and cytodifferentiation of the rat ovary. In *Progress in Differentiation Research*, eds. N. Muller-Bérat, C. Rosenfeld, D. Tavin and D. Viza. pp.453-462. Amsterdam: North-Holland.
- 82.-Merchant-Larios, H. and Coello, J. (1979) The effect of busulfan on rat primordial germ cells at the structural level. *Cell. Differ.* 8:145-155.
- 83.-Merchant-Larios, H.(1979) Origin of the somatic cells in the rat gonad: an autoradiographic approach. *Ann. Biol. Anim. Biophys.* 19: 1219-1229.
- 84.-Merchant-Larios, H. (1984). Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. In *Ultrastructure of Reproduction.* eds. J. Van Blerkom y P. M. Motta. Netherlands: Martinus Nijhoff Publisher. pp. 19- 30.

- 85.-Merchant-Larios, H. and Centeno B. (1981) Morphogenesis of the ovary of the sterile W/W mouse. *Advances in the morphology of cells and tissue*. N.Y. Alan R. Liss. pp. 383-392.
- 86.-Merchant-Larios, H. and Chimal-Monroy J. (1989). The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. In *Developments in Ultrastructure reproduction*. eds. J. Van Blerkom y P. M. Motta. Netherlands: Martinus Nijhoff Publisher. pp. 55-63.
- 87.-Moon, Y., Dorrington J. and Armnstrong, D. (1975) Stimulating action of follicle stimulating hormone on estradiol-17beta secretion by hipophysectomized rat ovaries in organ culture. *Endocrinology*. 97:244-247.
- 88.-Murphy, L., Bell, G. and Friesen, H. (1987). Tissue distribution of insuline-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology* 120:1279.
- 89.-Murphy, L. and O'Shaughnessy, P. (1991) Testicular steroidogenesis in the testicular feminized (Tfm) mouse: loss of 17a-hydroxylase activity. *Journal of Endocrinology*. 131:443-449.
- 90.-Nagamine, C., Taketo, T. and Koo, G. (1987a) Studies of the genetics of Tda-1 sex reversal in the mouse. *Differentiation*. 33:223-231.
- 91.-Nagamine, C., Taketo, T. and Koo, G. (1987b) Morphological development of the mouse gonad in Tda-1 sex reversal. *Differentiation*. 33:214-222.
- 92.-Nilson, L., Rosberg, S. and Ahren, K. (1974). Characteristics of the cyclic 3'-5'-AMP formation in isolated ovarian follicles from PMSG-treated immature rats after stimulation *in vitro* with gonadotropins and prostanglandins. *Acta Endocrinol*. 77: 559-594.
- 93.-Nishioka, Y. (1968). Application of the Y chromosomal repetitive sequences to sexing mouse embryos. *Teratology*. 38:181-185.
- 94.-Nishioka, Y. and Lamotte, E. (1986) Isolation and characterization of a mouse Y chromosomal repetitive sequence. *Gen*. 113:417-432.

- 95.-O'Shaughnessy, P., Pearce, S., and Mannan, A. (1989) Effect of high density lipoprotein on bovine granulosa cells: progesterone production in newly isolated cells and during cell culture. *J. Endocrin.* 124:255-260.
- 96.-Pehleman, F. and Lombard, M. (1978) Differentiation of ovarian and testicular interstitial cells during embryonic and postembryonic development in mice. *Cell. Tissue.* 188:465-480.
- 97.-Peluso, J. (1989) Role of the peripubertal pattern of FSH, LH and prolactin secretion in regulating *in vitro* steroidogenesis and follicular growth juvenile rat ovaries. *J. Reprod. Fertil.* 86:705-711.
- 98.-Quatropani, S. (1973) Morphogenesis of the ovarian interstitial tissue in the neonatal mouse. *Anat. Rec.* 177:569-594.
- 99.-Rajendran, K., Hwang, J. and Menoir, K. (1983) Binding degradation and utilization of plasma high density lipoproteins for progesterone production in cultured rat luteal cells. *Endocrinology* 112:1746-1753.
- 100.-Rao, M., Richards, J., Bernath, G., Midgley, A. and Reicher, L. (1977) Regulation of gonadotropin receptors by LH granulosa cells. *Endocrinology.* 101:512-523.
- 101.-Rappaport, M. and Smith, E. (1996) Insulin-like growth factor I inhibits aromatization induced by follicle-stimulating hormone in rat Sertoli cell culture. *Biol. Reprod.* 54:446-452.
- 102.-Rawn, J. (1989) *Bioquimica.* Tomo I. pp. 237-263.
- 103.-Richards, J., Rao, M., Bernath, G., Midgley, A. and Reicher, L. (1976) Ovarian follicular development in the rat: Hormone receptor regulation by estradiol, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone. *Endocrinology.* 99:1562-1570.
- 104.-Richards, J., Jonassen, J., Rolfes, G., Kersey, K. and Rechert, L. (1979) Adenosine 3',5'-monophosphate, luteinizing hormone receptor and progesterone during granulosa cell differentiation: effects of estradiol and follicle stimulating hormone. *Endocrinology.* 104:765-773.

- 105.-Richards, J. (1980) Maturation of ovarian follicles: Actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol. Rev.* 60:51-89.
- 106.-Richards, J., Jahnsen, T., Hedin, L., Lifka, J., Ratoosh, S., Durinca, J. and Goldring, N., (1987) Ovarian follicular development from physiology to molecular biology. In: *Recent Progress in Hormone Research*. pp. 231-276.
- 107.-Richards, J. (1993) Gonadotropin-regulated gene expression in the ovary. In: *The ovary*. 93-127
- 108.-Selstam, G., Rosberg, S., Liljekvist, J., Gronquist, L. Perklen, T. and Ahren K. (1976) Differences in action of LH and FSH on the formation of cyclic AMP in prepubertal rat ovary. *Acta Endocrinol.* 81:150-164.
- 109.-Shalgi, R., Kraicer, P., Renoir, A., Pinto, M. and Soferman, N. (1973) Proteins of human follicular fluid: the blood- follicular barrier. *Fertil. Steril.* 24:429-434.
- 110.-Shamasaki, S., Shimokana, M. and Ui, M. (1990) Structural characterization of a follicular-stimulating hormone action inhibitor in porcine ovarian follicular fluid. Its identification as the insulin-like growth factor-binding protein. *J. Biol. Chem.* 252: 2198-2202.
- 111.-Shiraishi, K., Singtripop, T. and Kawashima, S. (1993) Developmental changes of testicular gonadotropin levels in two strains of mice. *Zoological Science* 10:497-504.
- 112.-Short, R. (1961) Steroid concentrations in the follicular fluid of mares at various stages of the reproductive cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51:1469-1471.
- 113.-Simpson, E., Rochelle, D., Carr, B. and MacDonald, P. (1980) Plasma lipoproteins in follicular fluid of human ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51:1469-1471.
- 114.-Sinclair, A. H., Berta P., Palmer M. S., Hawkins J. R., Griffiths B. L., Matthijs S., Smith M. J., Foster J. W., Frischauf A. M., Lovell-Badge R. and Goodfellow P. N. (1990) A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif. *Nature* 346:240- 244.

- 115.-Skinner, M., Keski-Oja, J., Osteen, K., and Moses, H., (1987) Ovarian thecal cells produce transforming growth factor- β which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology* 121:786-92.
- 116.-Skinner, M. (1993) Transforming growth factor production and action in the ovarian follicle: Theca cell-granulosa cell interactions. In: *The ovary*. de. Adashi E. and Leung P. Raven Press, Ltd. New York.
- 117.-Steele, G. and Leung, P. (1993) Signal transduction mechanisms in ovarian cells In: *The ovary*. de. Adashi E. and Leung P. Raven Press, Ltd. New York.
- 118.-Strauss III, J., Schuler, L., Rosenblum, M., Tanaka, T. (1981) Cholesterol metabolism by ovarian tissue. *Adv. Lipid. Res.* 18:99-157.
- 119.-Sussenbach, J. and Steenbergh, P. (1991) Structural and regulatory aspects of the human genes encoding IGF-I and II. In: *molecular biology and physiology of insulin and insulin-like growth factors*. Raizada, M. y Roith, D. (eds). Plenum Press. New York. pp. 1-14.
- 120.-Taketo-Hosotani, T., Nishioka, Y., Nagamine, C., Villalpando, I. (1991) Development and fertility of ovarie in the B6Y.^{DOM} sex-reversed female mouse. *Development* 107:95-105.
- 121.-Toaff, M., Stauss III, J. and Hammond, J. (1983) Regulation of cytochrome P-450 scc in immature porcine granulosa cells by FSH and estradiol. *Endocrinology* 112:1156-1158.
- 122.-Thompson, E. and Siiteri, P. (1974). Utilization of oxigen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstendione. *J. Biol. Chem.* 249:5364-5372.
- 123.-Turner, C. and Bengara, J. (1971) *Endocrinology of the ovary*. General Endocrinology W. B. saunders Co, Philadelphia, London. Toronto. 399:490-543.
- 124.-Veldhuis, J., Furlanetto, R., Juchter, D., Garmy, J. and Veldhuis, P. (1985) Trophic actions of human somatomedin C/insulin-like growth factor on ovarian cells: *in vitro* studies with swine granulosa cells. *Endocrinology* 116:1235-1242.

- 125.-Veldhuis, J. (1989) Regulatory actions of the Insulin-like growth factor, IGF-I (somatomedin-C) on sterol metabolism by ovarian cells. In: Growth factors and the ovary. Anne N. Hirshfield (ed) Plenum Press, New York.
- 126.-Veldhuis, J. and Demers, L. (1985) A role for somatomedin C as differentiating hormone and amplifier of hormone action on ovarian cells: studies with synthetically pure somatomedin C and swine granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 130:234-40.
- 127.-Veldhuis, J., Hammond, J. (1986) Comparative effects of insulin and insulin-like growth factors on DNA synthesis and differentiation of porcine granulosa cells. *Endocrinology* 119:530-8.
- 128.-Villalpando, I., Nishioka, Y. and Taketo, T. (1993) Endocrine differentiation of the XY sex reversed mouse ovary during postnatal development. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 45:265-273.
- 129.-Wood, A., Lambert, A., Hooper, M., Mitchell, G. and Robertson, W. (1994) Exogenous steroids and the control of estradiol secretion by human granulosa lutein cells by follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-I. *Human Reproduction.* 9:19-23.
- 130.-Yamada, M., Yasue, S., Matsumoto, K. (1973) Formation of C₂₁-17-Hydroxysteroids and C₁₉-Steroides from 3 β -Hydroxypregn-5-en-20-one and progesterone *in vitro* by germ cells from immature rat testes. *Acta Endocrinol.* 93:81-87.
- 131.-Zelesnick, A., Midgley, A. and Reichert, L. (1974) Granulosa cell maturation in the rat: Increasing binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone *in vivo*. *Endocrinology* 95: 818-825.
- 132.-Zmigrod, A., Lidner, H. and Lamprecht, S. (1972) Reductase pathways of progesterone metabolism in the rat ovary. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 69:141-152.
- 133.-Zoller, L. and Weisz, J. (1978). Identification of cytochrome P-450 and its distribution in the membrane granulosa in the preovulatory follicle using quantitative cytochemistry. *Endocrinology* 103:310-313.

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