

71
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"FUNCION DEL FACTOR SEMEJANTE A INSULINA
TIPO I (IGF-I) EN LA PRODUCCION DE HORMONAS
SEXUALES EN EL OVARIO PREPUBER
DEL RATON XY"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMENEZ



MEXICO, D. F.

1998.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

264480

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

Jurado asignado

Presidente	Prof. Homero Hernández Montes
Vocal	Prof. Fernando García Tamayo
Secretario	Prof. María Irma Villalpando Fierro
1er Suplente	Prof. Martha Leticia Jiménez Pardo
2do Suplente	Prof. Elena Zambrano González

La presente tesis se desarrollo en el Laboratorio de Embriología Molecular del Departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. bajo la dirección de la Dra. María Irma Villalpando Fierro.



Dra. Irma Villalpando Fierro
Asesor



Perla Deyanira Maldonado Jiménez
Sustentante

Dedicatorias

A mi madre Macrina:

Por todos los sacrificios que pasaste para darnos una formación profesional. Gracias por haberme apoyado en todas las cosas grandes o pequeñas que emprendí y por haber confiado en mí; espero no haberte defraudado. Mamá esta tesis es el primer fruto, te la dedicó de corazón.

A mi padre Alfredo:

Por haberme dado la vida.

A mis hermanos:

Salatiel: Por entender mi forma de ser y de pensar y por escucharme cuando lo he necesitado.

Luis: Por ser un buen hermano que se ha preocupado siempre por nosotros. Gracias.

A mi tía Dolores:

Por cuidarme en los tiempos difíciles y por haberme hecho sentir en familia siempre.

A mis primos:

Anaid, Leonardo y Ulises: Por ser mis hermanos.

Dedicatoria especial

Gracias Dios por permitir que mis padres me dieran una formación.

Recuérdame que crea en el estudio, haciéndolo una aventura constructiva que me lleve a amar más.

Ayúdame a ser sincera, expresando sólo aquello que proceda de mi convencimiento.

Creo en el estudio, por ello haz que forje en mí ideales grandes y experiencias positivas.

Impide que otros se apoyen en mi silencio...

Ahora quiero ser libre, por ello haz que crea más en lo interior que en lo exterior.

Se que el camino aún es largo, por eso cultiva en mi el sentido del humor que me quite las amarguras del alma.

Agradecimientos

A la Dra. Irma Villalpando Fierro por su valiosa ayuda y paciencia en la realización del trabajo experimental y escrito; así mismo, por transmitirme sus conocimientos.

A D. G. A. P. A. por la beca otorgada durante la realización de este estudio, a través del financiamiento del proyecto de investigación IN215296 D. G. A. P. A. otorgado a la Dra. Irma Villalpando Fierro.

A la Facultad de Química de la U. N. A. M. por brindarme una formación profesional, para que el día de mañana pueda ser una persona útil a la sociedad.

A Floria y Horacio por su ayuda en la realización de la técnica de hibridación puntual.

A la Sra. Gloria por su ayuda en la limpieza y esterilización del material para la realización del trabajo experimental.

A Guadalupe, Lilia y Lolita por hacer grato el ambiente de laboratorio.

A todos los animales de laboratorio que son sacrificados para que la ciencia avance y se conozca más sobre la naturaleza.

A Dulce A. M. E. por ser una verdadera amiga. Gracias por todo el camino que recorrimos juntas.

A la escuelita: por los gratos momentos que pasamos juntos, por los viajes, por los juegos, las fiestas, etc.

A Betzabé por ser más que una amiga y por ayudarme en el análisis estadístico de los datos.

A Paty, Iesus y Rosalia por ser buenos amigos.

Al profesor Guillermo Barraza por enseñarnos que para cosechar realidades debemos sembrar ilusiones.

A Emilio F. Rubi, por darle un giro a mi vida. Gracias por estar conmigo.

A DIOS por poner en mi camino a todas estas personas que me han ayudado a crecer como ser humano y profesionalmente. Y por todas las cosas espirituales y materiales que me ha dado.

INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	
1. Diferenciación sexual de las glándulas reproductoras	2
1.1 Formación de la cresta genital	2-3
1.2 Gónada indiferenciada	3
1.3 Diferenciación sexual gonadal	4
a). Diferenciación ovárica	4
2. Desarrollo folicular	4
2.1 Hipótesis sobre el origen de los folículos	5-6
2.2 Foliculogénesis	6-7
2.3 Crecimiento folicular	7-8
2.4 Sitios intrafoliculares involucrados en la síntesis de esteroides	8-9
3. Hormonas hipofisiarias que controlan la función ovárica	9-10
3.1 Mecanismo de acción de las gonadotropinas	10
3.2 Efecto del estradiol sobre las células foliculares	10-11
3.3 Esteroidogénesis	11-12
3.4 Clasificación de los esteroides foliculares	12
a). Clasificación química	12-13
b). Clasificación biológica	13
1. Estrógenos	13-14
2. Andrógenos	14
3. Progestinas	14
4. Factor de crecimiento semejante a insulina tipo I	14
4.1 Generalidades	14-15
4.2 Organización	15-16
4.3 Funciones del IGF-I	16-17
5. El ratón B6.Y ^{DOM}	17-18
5.1 Morfología del ovario XY en la etapa fetal	19
5.2 Ciclicidad del ovario B6.Y ^{DOM}	19-20
5.3 Fertilidad de las hembras XY	20
5.4 Aspectos endocrinológicos	20-21
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS	22
IV. OBJETIVOS	23
V. MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1 Reactivos	24
5.2 Animales	24
5.3 Determinación del sexo cromosómico	24
a). Obtención de las muestras biológicas	24-25
b). Marcado de la sonda del cromosoma Y	25
c). Hibridación puntual	25-26

5.4 Aislamiento y cultivo por rotación de los ovarios	26-27
5.5 Radioinmunoanálisis	27-28
a). Estándares de testosterona	28
b). Radioinmunoensayo de testosterona	28-29
c). Especificidad del anticuerpo anti-testosterona	29
d). Estándares de androstendiona	29
e). Radioinmunoensayo de androstendiona	29-30
f). Especificidad del anticuerpo anti-androstendiona	30
5.6 Determinación de la actividad de la enzima 3β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa	30-31
5.7 Análisis estadístico de los datos	31
VI. RESULTADOS	
6.1 Efecto de la FSH y del IGF-I en la producción de andrógenos	32
a). Testosterona	32-33
b). Androstendiona	34-35
6.2 Acción de la LH y del IGF-I en la síntesis de hormonas masculinas	36
a). Testosterona	36
b). Androstendiona	37
6.3 Detección histoquímica de la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa	38-39
6.4 Organización histológica del ovario B6.Y ^{DOM}	39-40
VII. DISCUSIÓN	41-45
VIII. CONCLUSIONES	46
IX. BIBLIOGRAFÍA	47-53
X. APÉNDICE	54-56

GLOSARIO

AD	Androstendiona
ATP	Adenosina trifosfato
B6	Cepa de ratón C57BL/6J
cAMP	Adenosina 3',5'-cíclica monofosfato
cgp's	Células germinales primordiales
°C	Grados centígrados
cpm	Cuentas por minuto
dg	Días de gestación
dpp	<i>Días postpartum</i>
α dATP ³²	Desoxiadenosina trifosfato marcada con fósforo 32
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
DHEA	Dehidroepiandrosterona
E ₂	17 β -Estradiol
FSH	Hormona estimulante del folículo
h	Hora (s)
3 β -HSD	Enzima 3 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa
IGF-I	Factor de crecimiento semejante a insulina tipo I
IGF-II	Factor de crecimiento semejante a insulina tipo II
IGFBP's	Proteínas de unión a IGF's

lb/in ²	Libras por pulgadas cuadradas
LH	Hormona luteinizante
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mg/mL	Miligramo por mililitro
MEM	Medio mínimo esencial
μm	Micrometro
mm	Milímetro
ng	Nanogramo
ng/mL	Nanogramo por mililitro
P ₄	Progesterona
P ₅	Pregnenolona
pp	<i>Postpartum</i>
PBS	Buffer fosfato salina
RIA	Radioinmunoanálisis
rpm	Revoluciones por minuto
RNAm	Acido ribonucléico mensajero
T	Testosterona
UI	Unidades internacionales

I. RESUMEN

Durante la cruce del ratón *Mus musculus domesticus* con la cepa B6, el 50% de la descendencia XY, desarrolla ovarios bilaterales y fenotipo femenino. Las hembras XY tienen: baja producción de esteroides sexuales, ciclo estral irregular, retraso en la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de testosterona y disminución en la expresión del RNAm del IGF-I. En estudios realizados *in vitro*, se ha visto que el IGF-I sinergiza con la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH) aumentando los niveles de esteroides en las células de la granulosa y de la teca en diferentes especies de vertebrados, a través de un mecanismo hasta el presente desconocido. El papel del IGF-I en la producción de andrógenos en el desarrollo folicular temprano en el ratón no se ha estudiado en ninguna cepa. En el presente estudio se investigó el efecto del IGF-I en la síntesis de androstendiona (AD) y testosterona (T) en los ovarios del ratón B6.Y^{DOM} de 10-14 dpp, cultivados con IGF-I y con y sin FSH. Los ovarios se cultivaron con LH sólo a los 14 dpp. El sexo cromosomal de las hembras XY se detectó por hibridación puntual. Los andrógenos se cuantificaron por radioinmunoanálisis en fase sólida y líquida. Se observó que a los 11 y 14 dpp hay un efecto sinérgico de la FSH e IGF-I en la producción de T en los ovarios XX cultivados con FSH mientras que los niveles de los ovarios XX incubados sin hormona son bajos. A los 10, 12 y 14 dpp los niveles de T en los ovarios XY cultivados con y sin FSH son bajos. Así mismo, el IGF-I en los ovarios XY cultivados sin FSH y con IGF-I a los 12, 13 y 14 dpp tiene un efecto inhibitor. El IGF-I tiene un efecto inhibitor en la producción de AD en los ovarios XX cultivados con FSH a los 10 y 14 dpp y un efecto estimulante a los 11, 12 y 14 dpp en los ovarios cultivados con FSH. Estos resultados demuestran que el IGF-I tiene un papel dual como estimulante e inhibitor de la síntesis de andrógenos en el ovario del ratón B6.Y^{DOM}.

II. INTRODUCCIÓN

1. Diferenciación sexual de las glándulas reproductoras

La diferenciación sexual es un proceso secuencial y ordenado, en el cual el sexo cromosomal determina el sexo gonadal y éste a su vez influye en la diferenciación fenotípica de los individuos (Jost, 1947; 1953). El sexo cromosomal se determina genéticamente en la fecundación cuando un espermatozoide X ó Y, fertiliza a un ovocito que generalmente posee un cromosoma X, lo cual, da origen a individuos homocigotos XX o heterocigotos XY que desarrollan ovarios o testículos respectivamente. El cromosoma Y contiene en la región pseudoautosomal del brazo corto al gen Sry que determina la formación de testículos (Berta y col, 1990; Gubbay y col, 1990, Sinclair y col, 1990; Koopman y col, 1991). La presencia de este desencadena una serie de eventos genéticos que van a determinar también el destino final de los órganos sexuales.

1.1 Formación de la cresta genital

La primera manifestación que se aprecia en el desarrollo de las gónadas son los pliegues de las crestas genitales que se forman por la proliferación del epitelio celómico y condensación del mesénquima adyacente. Uno de los tipos celulares que participan en la formación de estos órganos son las células germinales primordiales (cgp's) que invaden la cresta genital a los 9 días de gestación (dg) (Guillman, 1948). En el ratón estas células aparecen en una etapa temprana del desarrollo entre las células endodérmicas de la pared del saco vitelino cerca del alantoides (Mintz, 1960; Pinkerton y col, 1961). Estas células migran por movimientos pasivo y activo; en el primero las cgp's son acarreadas del endodermo del saco vitelino por los tejidos que las rodean durante el crecimiento de los embriones hasta el mesenterio dorsal del intestino

posterior. El movimiento de las cgp's es activo para salir del intestino posterior atravesando la lámina basal que lo recubre y llegar hasta las crestas genitales y este se caracteriza por emisiones de lamelipodios y filopodios de las cgp's capaces de romper la lámina basal del intestino (Merchant-Larios & Alvarez-Buylla, 1986). La región donde se desarrollará la futura gónada contiene además de las cgp's a las células somáticas estrechamente unidas a la superficie del epitelio y en el ratón esta etapa se presenta a los 9 dg (Merchant-Larios, 1991b). Durante la migración de las cgp's el epitelio celómico de la cresta genital prolifera y las células epiteliales penetran en el mesénquima adyacente (Paranko, 1986). En esta etapa temprana de formación de la gónada hay 3 características morfogénicas importantes que considerar: 1). condensación de las células somáticas a lo largo de la cresta genital, 2). depósitos graduales de lámina basal sobre la superficie libre de las células epiteliales y 3). una baja actividad mitótica de las células epiteliales en la cresta genital; como consecuencia de estos cambios se forman los cordones sexuales en la cresta genital tanto en las gónadas XX como en las XY (Merchant-Larios y col, 1991a).

1.2 Gónada indiferenciada

La proliferación de las células mesenquimáticas, endoteliales y epiteliales contribuyen a la formación de los cordones sexuales presentes en las hembras y los machos que son característicos de la etapa de "gónada indiferenciada" (Merchant-Larios, 1975; Pelliniemi, 1975). Durante esta fase se requiere de la diferenciación y el arreglo espacial de las células dentro de los cordones sexuales, que están unidos al epitelio de la superficie en los embriones masculinos y femeninos. De tal manera que en esta etapa es imposible diferenciar entre la gónada femenina y la masculina, por lo que se le denomina gónada indiferenciada.

1.3 Diferenciación sexual gonadal

a). Diferenciación ovárica

La gónada femenina crece lentamente en comparación con el testículo, de tal forma que la separación del epitelio celómico de la superficie tarda en llevarse a cabo y la diferenciación ovárica sólo puede diagnosticarse por la carencia de características testiculares. Al inicio de la diferenciación ovárica, el tejido estromal es escaso y en los cordones sexuales las células epiteliales se dividen lentamente, contrario a la velocidad de proliferación de las ovogonias. En contraste con el testículo, la falta de vascularización y la cantidad de tejido conectivo son escasos. En el ovario los cordones epiteliales mantienen su continuidad con el epitelio superficial y las cgp's que se encontraban en mitosis entran tempranamente en la profase de la primera división meiótica. La proliferación e invasión por células estromales se ve en aquellos ovarios que están carentes de ovocitos alrededor de los 3 dg, en esta etapa los primeros folículos primordiales empiezan a formarse en el ovario normal (Merchant-Larios, 1991b).

2. Desarrollo folicular

En el ratón a los 12 dg el ovario es muy parecido morfológicamente a la gónada indiferenciada hasta que este órgano inicia la meiosis a los 16 dg. Sin embargo, en esta especie el proceso de foliculogénesis empieza a los 17 dg. El desarrollo de la gónada femenina en la fase embrionaria se caracteriza por la gran actividad mitótica de las cgp's (Ohno, 1967; Peters, 1978). Antes del nacimiento y por señales aún desconocidas, la actividad mitótica de estas células cesa y entran en la profase de la primera división meiótica. En este momento las cgp's se denominan ovocitos y permanecen detenidos en esta fase hasta que degeneran (atresia) o son liberados en la ovulación (Baker, 1963; Byskov, 1974; Peters, 1978).

2.1 Hipótesis sobre el origen de los folículos

Existen varias hipótesis que tratan de explicar la foliculogénesis en el ratón, entre las más aceptadas está el modelo propuesto por Merchant-Larios y Chimal en 1989. Estos autores plantean 3 etapas para este proceso: I. "etapa de ovocito" en la que grupos de ovocitos se encuentran rodeados por células epiteliales separadas de las células estromales por una delgada lámina basal dentro de los cordones sexuales, II. "etapa epitelial" la cual comienza después del inicio de la meiosis en la región medular y en la que el ovocito está rodeado por células epiteliales dentro de los cordones sexuales. Los folículos localizados en esta región permanecen interconectados por puentes epiteliales y el proceso de individualización folicular difunde fuera del ovario y III. "etapa estromal" en la que los ovocitos y las células epiteliales están envueltos por una lámina basal y son individualizados por tejido estromal. Esta etapa se alcanza cuando el ovocito está en la fase de diploteno.

Otro modelo de foliculogénesis propone que las células de la gránulosa se originan del "rete ovarii" (Byskov, 1974; 1978; Byskov & Lintern-Moore, 1973; Peters, 1969; 1978), y que estas se organizan alrededor del ovocito primario (Byskov, 1974; Byskov & Lintern-Moore, 1973). Estos autores denominan "rete ovarii" a la continua asociación de los cordones sexuales con los restos de túbulos mesonéfricos. Las unidades resultantes forman una mezcla de folículos pequeños primordiales, que permanecen unidos al estroma de la corteza, por debajo de la túnica albugínea, hasta que alguna señal provoca su crecimiento. Sin embargo, poco se sabe de las señales y los factores que inician y controlan el crecimiento de los folículos primordiales. Durante el desarrollo del ovario se establecen 3 procesos morfogénéticos importantes para el desarrollo de este órgano: 1). los folículos primordiales se forman por división de los cordones sexuales y se sitúan principalmente en la porción medular del

ovario, más tarde desaparecen y son sustituidos por la médula ovárica, 2). los ovocitos son necesarios para el establecimiento de folículos primordiales y 3). consecuentemente en ausencia de ovocitos, los cordones sexuales permanecen en el ovario (Merchant-Larios, 1991a).

2.2 Foliculogénesis

La unidad anátomo-funcional en el ovario de los mamíferos es el folículo, el cuál esta formado por: cgp's de origen extragónadal, células de la granulosa, células de la teca, vasos, venas y células del sistema inmune. El folículo comienza su desarrollo como folículo primordial, que consiste en un ovocito detenido en la etapa de diploteno de la profase I, rodeado de pocas células de la granulosa. El número de ovocitos presentes al nacimiento varia de acuerdo con la especie, pero en todos los casos este excede grandemente al número requerido en la vida reproductiva. Una vez que la población de folículos primordiales se ha establecido, los folículos continuamente son reclutados para crecer en respuesta a señales aún desconocidas; su crecimiento en esta etapa es independiente de la FSH y LH. Posteriormente el ovocito crece y las células de la granulosa proliferan para formar una estructura multilaminar llamada folículo preantral. Una vez que el folículo ha alcanzado cierto tamaño, se forman espacios llenos de fluido folicular conocidos como *antrum*, que caracteriza a los folículos antrales, los cuales están formados de un ovocito completamente desarrollado rodeado por células de la granulosa y de la teca interna y externa; en esta etapa los folículos son dependientes de FSh y LH para su futuro desarrollo y crecimiento (Telfer, 1996). Goodman & Hodgen en 1983, sugirieron el uso de los siguientes términos para describir la foliculogénesis: a). reclutamiento, un evento dependiente de gonadotropinas en el cual, un

grupo de folículos adquieren la capacidad para responder a las gonadotropinas y requiere de estas para seguir creciendo, b). selección, un proceso según el cual un número reducido de los folículos reclutados, se seleccionan para ovular y c). dominancia, mecanismo que emplea un folículo ovulatorio para escapar de la atresia. Se sabe que los picos de FSH en el proestro y en el estro regulan el reclutamiento de los folículos para la ovulación en el siguiente ciclo (Hirshfield & Midgley, 1978; Chappel & Selker, 1979) lo que indica que la FSH tiene un papel clave en el proceso de reclutamiento. La selección puede empezar en la etapa preantral de la foliculogénesis involucrando 3 etapas: 1). capacidad del folículo preantral de responder a las gonadotropinas, 2). elaboración de factores inhibidores por el folículo dominante y 3). la retroalimentación entre los folículos dominantes y la glándula pituitaria (Ireland, 1987). El fenómeno de dominancia sugiere que algunos folículos sobreviven en un medio represivo para el crecimiento de otros folículos o que algunos folículos dominantes elaboran factores hormonales y no hormonales que controlan la selección por modulación gonadotrópica del proceso de reclutamiento, inhibiendo el crecimiento de otros folículos pero no el propio (Ireland, 1987).

2.3 Crecimiento folicular

La edad en que comienza el crecimiento folicular depende de la especie, en algunos mamíferos como: el chivo, la vaca, el mono o el humano este proceso se inicia en la vida fetal, mientras que en el ratón, la rata, el conejo o el hamster, comienza en el período perinatal (Lintern-Moore, 1972; Peters, 1978). Una vez iniciado el crecimiento folicular este continúa toda la vida y ocurre independientemente del estado fisiológico del animal. Este proceso se asocia con un decremento en el número de folículos que empieza a crecer y a ovular

(Faddy y col, 1976; Jones & Krohn, 1961a; b; Peters, 1978). El crecimiento de un folículo dado parece empezar por la proliferación de las células de la granulosa y la organización de las células tecales externas en la membrana basal (Peters, 1969; 1978).

2.4 Sitios intrafoliculares involucrados en la síntesis de esteroides

Estudios realizados en la rata indican 4 tejidos productores de esteroides: las células de la granulosa, las células de la teca, las células intersticiales y el cuerpo luteo, siendo el sitio de mayor producción folicular de andrógenos las células de la teca (Falck, 1959). La evidencia indica que tanto las células de la granulosa como las de la teca contribuyen a la síntesis de estradiol (E_2) (Richards, 1980). Los estudios de Falck (1959) proveen evidencia que la síntesis ovárica de estrógenos requiere la interacción de al menos 2 tipos de células, las células de la teca o intersticiales y las células de la granulosa o las luteales. Las células de la granulosa pueden convertir testosterona (T) y androstendiona (AD) en E_2 debido a que poseen el sistema de aromatasas pero no pueden sintetizar andrógenos a partir de progesterona (P_4) y pregnenolona (P_5) (Bjersing, 1978; Makris & Ryan, 1975; Moon y col, 1975; Watson & Howson, 1977). Estudios realizados en conejos (Erickson & Ryan, 1976) y en ratas (Fortune & Armstrong, 1977) indican a las células de la teca como una de las fuentes de andrógenos. Posteriormente se propuso que los andrógenos producidos y liberados por un tipo de célula (células de la teca) podían difundir y ser aromatizados a E_2 por un segundo tipo de células (las células de la granulosa) (Bjersing, 1978, Bjersing & Cartensen, 1962;). Las células de la granulosa muestran una producción de P_4 especialmente en respuesta a la hormona luteinizante (LH) endógena o exógena (Channing & Seymour, 1970). Se sabe que la FSH en presencia de T aumenta la acumulación de E_2 en las células de la granulosa, lo que sugiere que el incremento

en la actividad de la aromatasas es dependiente de E_2 (Erickson & Hsueh, 1978; Moon y col, 1975).

3. Hormonas hipofisiarias que controlan la función ovárica

La FSH y la LH son las hormonas proteínicas principales involucradas en la foliculogénesis (Hisaw, 1947). Las gonadotropinas aumentan la actividad esteroidogénica en las células de la granulosa y de la teca después de la interacción con su receptor y de la activación de algunos procesos dependientes de cAMP, lo que resulta en un incremento en la síntesis y la acumulación de esteroides especialmente E_2 en el fluido folicular de los folículos antrales (Richards, 1980). Así el folículo(s) dominante(s) deben poseer una mayor capacidad sobre otros folículos para sintetizar y liberar E_2 . La mayor capacidad para producir esta hormona involucra la acción de la FSH y de la LH sobre las células de la granulosa y de la teca, estas células contienen un gran número de receptores para factores hormonales y no hormonales muchos de los cuales son regulados positiva o negativamente por la FSH y LH. Esto apoya el concepto de que las gonadotropinas son los estimuladores primordiales de la foliculogénesis (Hisaw, 1947). Las células de la granulosa en los folículos preantrales poseen receptores para la FSH y no tienen para la LH hasta que se forma el *antrum* empezando en la etapa preantral de desarrollo. Las células de la teca de los folículos preovulatorios en los cerdos (Channing & Kammerman, 1974) y en las ratas (Uilenbroek & Richards, 1979) contienen receptores para la LH pero no para la FSH lo que indica que la diferenciación de las células de la teca depende de la LH y puede ser importante para futuros cambios en la función de las células de la granulosa (Richards, 1980). Durante la foliculogénesis, la FSH induce la aparición de su propio receptor y del receptor de la LH en células de la granulosa, además, esta hormona es

requerida para la conservación de los receptores a gonadotropinas durante la foliculogénesis (Richards, 1980). El desarrollo de folículos antrales pequeños se asocia a cambios en la función de las células de la teca y de la granulosa y a un aumento en la sensibilidad de las células foliculares a gonadotropinas. La síntesis de andrógenos se localiza en las células de la teca (Fortune & Armstrong, 1977). Debido al bajo número de receptores en estas células en los folículos antrales pequeños, estas no producen andrógenos ya que no pueden responder a bajas concentraciones de LH. Durante la maduración de los folículos preovulatorios, quizá en respuesta a pequeños aumentos de la LH, la concentración del receptor de esta hormona en las células de la teca se incrementa de 2 a 3 veces, acompañado por un incremento en la producción de T (Richards, 1980).

3.1 Mecanismo de acción de las gonadotropinas

El mecanismo de acción de las gonadotropinas propuesto es el siguiente: las gonadotropinas se unen a su receptor y activan el sistema de la adenilato ciclasa-cAMP, lo que resulta en la activación de la proteína cinasa y la fosforilación de varias enzimas en las células de la granulosa y de la teca que pueden estar involucradas en la foliculogénesis; sin embargo, no se sabe como estas proteínas fosforiladas en respuesta a la FSH y a la LH están involucradas en la inducción de receptores, la activación de enzimas para la esteroidogénesis y otras facetas de la foliculogénesis.

3.2 Efecto del estradiol sobre las células foliculares

El E_2 por si mismo actúa como una hormona intrafolicular, siendo las células de la granulosa su blanco (Richards, 1975). Se cree que el E_2 aumenta la respuesta de las células de la

granulosa a la FSH debido a la acumulación de cAMP y al aumento en el número de células de la granulosa por el ovario y no por un aumento en el número de receptores a la FSH. (Makris & Ryan, 1975; Richards y col, 1976). El posible mecanismo para explicar este aumento es el siguiente: el E₂ se une a su receptor en la superficie externa formando el complejo E₂R el cual atraviesa la membrana y es translocado al núcleo de las células de la granulosa (Richards, 1975). Se cree que este complejo se une a sitios "aceptores" nucleares donde altera la expresión génica, esto incrementa la síntesis de mRNA y con ello se genera un cambio en los componentes del sistema de respuesta a la FSH (Richards, 1980).

3.3 Esteroidogénesis

Los productos secretados mejor conocidos y caracterizados del folículo son las hormonas esteroides, que desempeñan importantes funciones en la reproducción. Estas hormonas son transportadas en la circulación y actúan en diferentes órganos como en el sistema nervioso central, el hígado y otros. Además actúan de manera parácrina sobre células adyacentes o autócrina sobre o dentro de las células que los produjeron (Gore & Armstrong, 1988).

Durante la foliculogénesis las células tecales responden primero a la LH activando la 17-20-desmolasa (enzima que rompe la cadena lateral del colesterol) (Erickson y col, 1985) permitiendo a las células de la teca sintetizar andrógenos. Sin embargo, las células de la granulosa que no producen andrógenos son incapaces de producir E₂ hasta que las células de la teca se diferencian a una célula productora de andrógenos. La FSH y la LH aumentan el consumo de lipoproteínas, la liberación de colesterol de estas, la movilización y la conversión de colesterol en P₅ y la conversión de P₅ en P₄, a través, de la activación de la 3β-HSD en las células de la granulosa. Algunos inhibidores de la unión de FSH y LH presentes en el fluido

folicular (como IGF-I) pueden inhibir la síntesis de E_2 . La actividad de las enzimas esteroideas y la síntesis de E_2 en un folículo dominante, puede no sólo ser controlada por proteínas inhibitorias, sino por una compleja interacción de esteroides ováricos con las enzimas esteroideas. Por ejemplo los andrógenos aumentan la actividad de aromatasas, mientras que los estrógenos inhiben la producción de andrógenos (Leung & Armstrong, 1980).

3.4 Clasificación de los esteroides foliculares

Las hormonas esteroideas pueden clasificarse en base a su estructura química o a su acción biológica. El folículo ovárico produce 3 clases de esteroides en una o más etapas del desarrollo, estos son: progestinas, andrógenos y estrógenos.

a). Clasificación química

Esta clasificación asocia a todos los esteroides que en su estructura contienen como núcleo al ciclopentanoperhidrofenantreno (figura 1).

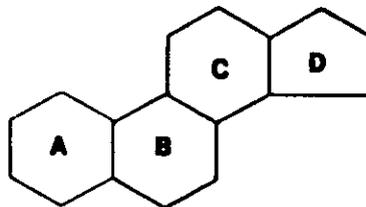


Figura 1. Estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno

El ovario produce 3 clases de esteroides: a). progestanos, b). androstanos y c). estranos. Los primeros están representados por las progestinas de 21 carbonos, los segundos por los andrógenos formados por 19 carbonos y los últimos por los estrógenos con 18 carbonos. (Gore & Armstrong, 1988) (Figura 2).

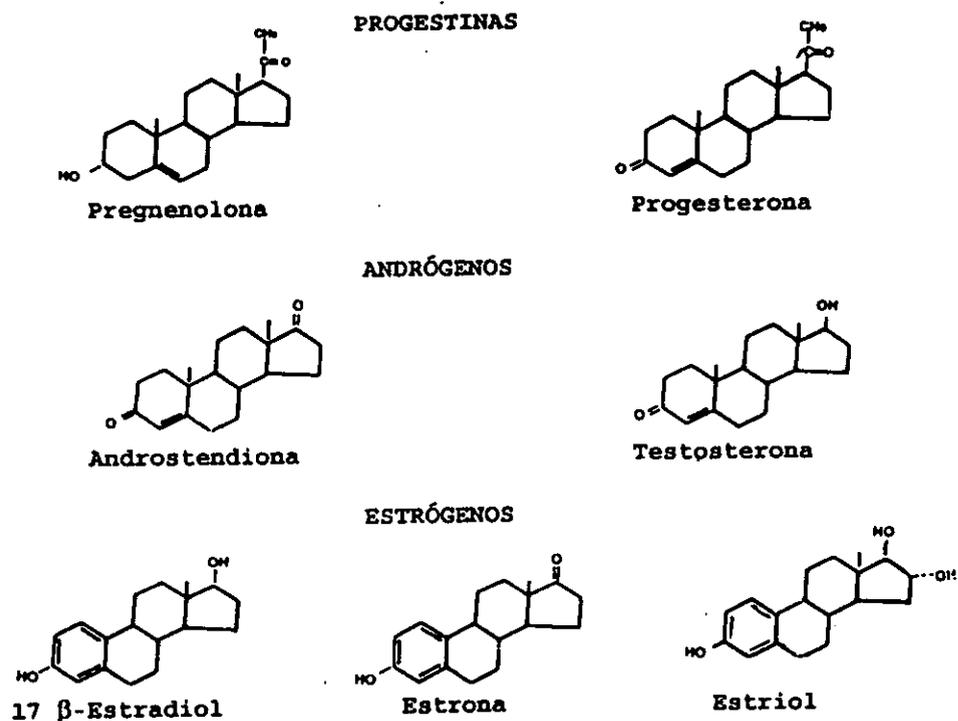


Figura 2. Estructura química de los esteroides ováricos.

b). Clasificación biológica

Los esteroides ováricos también pueden clasificarse de acuerdo a su función biológica en progestinas, andrógenos y estrógenos.

1. Estrógenos

Fisiológicamente los estrógenos como la estrona (E_1) y el 17β -estradiol (E_2) son los esteroides foliculares más importantes, juegan un papel clave en la fisiología reproductiva de

las hembras. La E_1 (3-hidroxi-estra-1,3,5(10)trien-17ona) fue el primer esteroide sexual que se identificó. El E_2 (estra-1,3,5(10)-trieno-3,17 β -diol) es aproximadamente 10 veces más potente que la estrona y es el más activo de todos los esteroides producidos por el ovario.

2. Andrógenos

La identificación de AD y T en fluido folicular (Short, 1960) establece al folículo como una fuente significativa de andrógenos ováricos. Se considera que la AD y T son los precursores inmediatos de los esteroides estrogénicos: E_1 y E_2 respectivamente. También se han identificado andrógenos ováricos no aromatizables importantes, producidos por la saturación del anillo A del núcleo esteroideo (Zmigrod y col, 1972;). Andrógenos 5α -reducidos se han identificado en varias especies incluyendo 5α -dihidrotestosterona, androsterona, epiandrosterona y otros.

3. Progestinas

La pregnenolona (3 β -hidroxipreg-5-en-20ona) es la progestina más importante producida por el folículo ya que es el precursor clave de las hormonas esteroideas. El producto más abundante de 21 carbonos en el folículo es la progesterona (pregn-4-ene-3,20diona), producida como un intermediario biosintético en todas las etapas del crecimiento. Otras progestinas de origen folicular incluyen: 17 α -hidroxiprogesterona precursor inmediato de los esteroides aromatizables.

4. Factor de crecimiento semejante a insulina tipo I

4.1 Generalidades

Los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGF's) son una familia de péptidos que circulan en la sangre y juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de

diferentes vertebrados (Sara & Hallk, 1990; Daughaday & Rotwein, 1989). Tanto el IGF-I como el IGF-II son estructuralmente parecidos a la proinsulina, el IGF-I circulante es producido principalmente por el hígado en respuesta a la hormona de crecimiento y está involucrado en el crecimiento y desarrollo postnatal. Así mismo, muchos tejidos como el ovario, útero y otros tejidos (Murphy y col, 1987) expresan el RNAm y el péptido mismo, el cual se cree que tiene un efecto autócrino o local. (D'Ercole y col, 1984). Se sabe que el ovario de rata contiene altos niveles de IGF's y/o sus mRNA y esto puede estar sujeto a regulación gonadotrópica, ya que en ovarios tratados con FSH se incrementa la expresión del IGF-I (Davoren & Hsueh, 1986b; Ramasharma y col, 1986). Los efectos biológicos de los IGF's son mediados por su unión reversible y saturable a receptores en la superficie de las células de la granulosa (Rechler & Brown, 1992; Adashi y col 1988) y de la teca de rata (Hernandez y col, 1988). Otro componente de esta familia son las IGFBP's, que al unirse en la circulación a los IGF's los inactivan evitando la interacción con sus receptores lo que prolonga su vida media; para activarlos los transportan y liberan cerca de sus receptores en la superficie celular. A nivel tisular, las IGFBP's regulan las interacciones de los IGF's con su tejido blanco y pueden realzar o inhibir sus efectos (Baxter & Martín, 1989; Rechler & Brown, 1992).

4.2 Organización

El IGF-I maduro es un péptido de 70 aminoácidos, que al igual que la insulina, contiene un dominio A y otro B, pero difiere de esta en dos aspectos: 1). conserva un péptido C corto y 2). contiene una secuencia adicional en el extremo carboxilo terminal, conocido como dominio D. El IGF-I se sintetiza como una larga molécula (prepro-IGF-I) que contiene un péptido señal, así como un péptido de extensión en el extremo carboxilo terminal, el péptido E; tanto el

péptido señal como el péptido E son cortados durante el proceso de maduración del IGF-I. El proceso inicial de prepro-IGF-I a pro-IGF-I involucra el rompimiento del péptido E, lo cual, se cree que ocurre en la cara trans del aparato de Golgi o en las vesículas secretoras (Daughaday & Rotwein, 1989).

4.3 Funciones del IGF-I

Se sabe que las células de la granulosa de rata expresan el IGF-I (Adashi y col, 1989), el cual, sinergiza con otros reguladores hormonales autócrinos o parácrinos como factores de crecimiento, hormonas gonadales o hipofisarias para promover la diferenciación de las células de la granulosa (Davoren y col, 1986a). Se ha planteado que el IGF-I aumenta la producción de P₄ (Adashi y col, 1985a; Davoren y col, 1985), y estrógenos (Adashi y col, 1985b) ya que aparentemente sinergiza con la FSH. Así mismo, se ha propuesto que el IGF-I aumenta la concentración de receptores para FSH (Adashi y col, 1992) y estimula la síntesis de andrógenos en las células de la teca-intersticiales. El IGF-I puede servir como una señal central ya que tanto las células de la granulosa como las tecaes expresan cantidades significativas de receptores para IGF-I, de esta manera puede promover el crecimiento y/o la diferenciación de las células de la granulosa actuando como un amplificador de la acción de gonadotropinas. Se propone que en la rata el IGF-I puede actuar de manera autócrina para regular la esteroidogénesis ya que aumenta la biosíntesis de progestinas en las células ováricas probablemente activando cuatro mecanismos complementarios: 1). estimula la unión de las lipoproteínas de baja densidad con su receptor en la célula y la utilización del colesterol de estas lipoproteínas (Veldhuis y col, 1987b), 2). incrementa la síntesis *de novo* del colesterol en las células ováricas estimulando la β -hidroxi- β -metilglutaril CoA reductasa (Veldhuis y

Rodgers, 1987a), 3). acelera la formación y degradación de los estéres de colesterol ya que estimula la actividad enzimática de la acil CoA colesterol acil transferasa (Veldhuis y col, 1985) y 4). estimula la síntesis de proteínas que rompen la cadena lateral del colesterol como la citocromo P-450 20,22 desmolasa y la adrenodoxina (Vedhuis y col, 1986; Vedhuis & Rodgers, 1987a). Los efectos del IGF-I sobre la homeostasis del colesterol en las células de la granulosa indican que juega un papel crítico en la diferenciación esteroidogénica de las células de la granulosa-luteales durante el desarrollo folicular preovulatorio. Por otro lado, Hernández y col (1988), encontraron que las células intersticiales-tecales pueden ser un sitio de recepción y acción del IGF-I ya que concentraciones fisiológicas de este factor, pueden participar en la regulación de la síntesis ovárica de andrógenos. Lo cual esta de acuerdo con la posibilidad de que el IGF-I originario de las células de la granulosa puede no sólo estar implicado en el control autócrino de la ontogenia de las células de la granulosa, sino también intervenir en la síntesis de estrógenos. Se cree que el IGF-I aumenta la síntesis de andrógenos debido en gran parte a que estimula la formación de estos más que su degradación. Aunque la significancia fisiológica de estos hallazgos son inciertos, se puede especular si el IGF-I de las células de la granulosa puede interactuar con las células tecales-intersticiales adyacentes modulando el flujo de andrógenos de acuerdo con las necesidades del folículo ovárico en desarrollo. (Hernandez y col, 1988).

5. El ratón B6.Y^{DOM}

La presencia del cromosoma Y determina el desarrollo del testículo; por lo que se propone que una sola copia del gen SRY/Sry en humanos y en otras especies respectivamente, es el factor genético determinante del testículo (Berta y col, 1990; Gubbay y col, 1990; Sinclair y

col, 1990; Koopman y col, 1991). Sin embargo, cuando el cromosoma Y del ratón *M. m. domesticus* (Y^{DOM}), se introduce a través de la cruce con hembras de la cepa B6, la progenie XY ($B6.Y^{DOM}$) desarrolla ovotestis u ovarios bilaterales pero no testículos normales en la vida fetal. Durante el período neonatal, los componentes ováricos de los ovotestis tienden a degenerar y en la pubertad, el 50% de la progenie XY puede tener testículos bilaterales aunque más pequeños, desarrollar un testículo o un ovario contralateral derecho o izquierdo mientras, que la otra mitad desarrolla ovarios bilaterales y genitales femeninos internos y externos (Eicher y col, 1982; Eicher & Washburn, 1983; 1986; Taketo y col, 1989; Nagamine y col, 1987) (Figura 3). Estos hallazgos sugieren que la sola presencia del gen Sry, no es suficiente para inducir la diferenciación testicular.

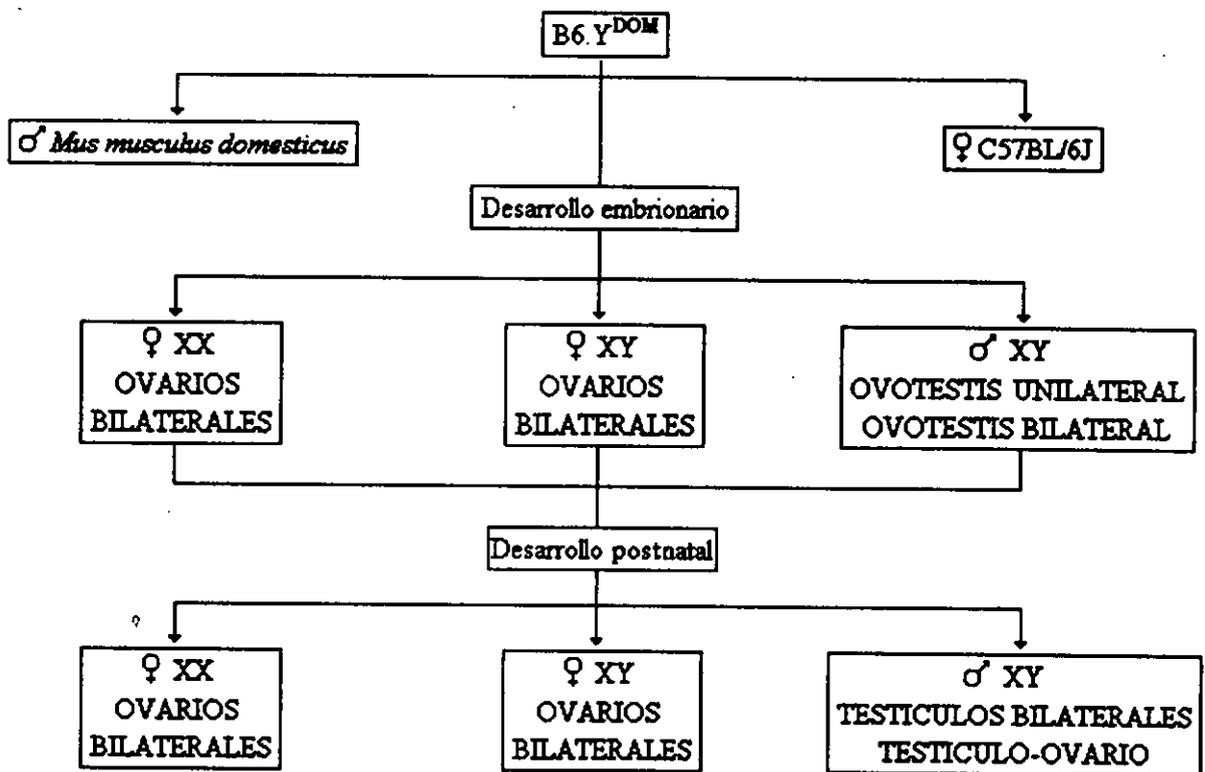


Figura 3. Se muestra la cruce de la cepa *Mus musculus domesticus* con la cepa B6 para la obtención de las hembras $B6.Y^{DOM}$

5.1 Morfología del ovario XY en la etapa fetal

Taketo y col (1989) encontraron que el ovario XY es morfológicamente indistinguible del ovario XX hasta los 16 dg, cuando ambos contienen abundantes células germinales que han entrado en la profase meiótica. Entre los 16 y 19 dg, muchos ovocitos del ovario XY degeneran en la zona central de la gónada, esto parece ocurrir a la mitad o al final del paquiteno, sin embargo, los ovocitos de la corteza sobreviven y participan en la formación de folículos. En el ovario XX, el primer grupo de ovocitos alcanza el diploteno e induce la formación folicular en la médula, la segunda semana después del nacimiento los folículos han iniciado el crecimiento en la región medular de estos ovarios. Algunos folículos sufren atresia y forman parte del tejido esteroideogénico intersticial. En contraste, el ovario XY contiene folículos primordiales y de crecimiento sólo en la corteza; mientras la región medular es ocupada por restos de cordones sexuales estériles rodeados de tejido estromal. Al rededor del mes de nacimiento, los cordones no se distinguen en el ovario XY, ya que la región medular se encuentra ocupada por grandes folículos procedentes de la corteza (Taketo y col, 1989). El número de folículos en el ovario XY es menor que en el ovario XX ya que a los 2 meses pp, se observan muy pocos folículos en el ovario XY, mientras que en el ovario XX están presentes en varias etapas. A pesar, de que los ovocitos de la médula no contribuyen con el proceso de la ovulación tanto en ovarios XX como en los XY en la pubertad, la ausencia de desarrollo folicular y la subsecuente atresia en la médula durante el período neonatal son una característica del ovario XY (Taketo y col, 1989).

5.2 Ciclicidad del ovario B6.Y^{DOM}

Todas las hembras XX de 70-90 dpp, muestran un ciclo estral regular (ciclo de 3-5 días); en

tanto que las hembras XY a la misma edad poseen un ciclo estral irregular manteniéndose en constante diestro. Las hembras XY de 110-150 dpp, se encuentran en estado de cornificación vaginal consistente. Estos resultados se corroboraron ya que al ovariectomizar y transplantar hembras XY con ovarios XX, estas inician un ciclo estral regular que continua al menos hasta los 120 dpp. Por otro lado, hembras XX ovariectomizadas y transplantadas con ovarios XY detienen la ciclicidad estral y se mantienen en diestro, en etapa de cornificación vaginal persistente o entre ambas (Taketo y col, 1989). Con éstos resultados, ellos sugieren que la infertilidad de las hembras XY es debida a un defecto dentro del ovario, pero estos resultados no excluyen la posibilidad de que una anomalía fuera de la gónada resulte en un defecto dentro del ovario XY durante el desarrollo.

5.3 Fertilidad de las hembras XY

Las hembras XY se aparean normalmente con los machos, pero no son fértiles debido a que los ovocitos ovulados por el ovario XY no se desarrollan después de la etapa de dos células *in vitro* debido a que no se lleva a cabo la implantación de los embriones (Merchant-Larios y col, 1994). Estos resultados concuerdan con los observados previamente por Eicher y col (1982), aunque ella encontró una hembra XY fértil.

5.4 Aspectos endocrinológicos

Villalpando y col, (1993), encontraron que el ovario XY generalmente produce menores niveles de esteroides que el ovario XX en períodos neonatales y durante la pubertad. Además, que el ovario XY no responde a gonadotropinas para la producción de P₄ y T. Sólo un trabajo se ha realizado sobre las características endocrinológicas del ovario XY, en el cual Villalpando

y col (1993), encontraron que al 1 dpp son detectables los niveles de P_4 y los niveles de E_2 son bajos tanto en ovarios XX como en los XY y no se detectan niveles de T en ambos ovarios. El mayor rasgo distintivo entre los ovarios XX y XY es su respuesta a gonadotropinas, ya que la gonadotropina de yegua preñada incrementa la producción de T por el ovario XX pero no por el XY a los 14 y 35 dpp. Se ha reportado que la AD pero no la T es producida predominantemente por el ovario neonatal del ratón (Mannan & O'Shaughnessy, 1988; 1991), Villalpando y col. (1993) encontraron que los niveles de AD fueron mayores que los de T a los 14 y 35 dpp. Sin embargo, no encontraron diferencias significativas entre los ovarios XX y XY en presencia de PMSG. El valor medio de AD producido por el ovarios XY es menor que el del ovario XX a los 35 dpp lo que concuerda con los bajos niveles de los otros esteroides detectados.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

La presencia del cromosoma Y determina el desarrollo normal de los testículos en los mamíferos, sin embargo, cuando el ratón *Mus musculus domesticus* se cruza con hembras B6, ningún ratón de la progenie XY (B6.Y^{DOM}) desarrolla testículos normales en la vida fetal y la mitad de esta población desarrolla ovarios bilaterales y genitales femeninos internos y externos. Aunque las hembras XY parecen normales fenotípicamente carecen de un ciclo estral regular, son infértiles, producen menores niveles de esteroides como E₂, P₄ y T y tienen un retraso en la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis de los andrógenos y además, se observa una disminución en la síntesis de mRNA del IGF-I. Se ha visto que la biosíntesis y el metabolismo de las hormonas en las células de la granulosa de humanos, monos, cerdos, conejos y otras especies al cultivarse con IGF-I, FSH y LH incrementan la síntesis de esteroides a través de un mecanismo desconocido. Sin embargo, la función del IGF-I en el ovario del ratón no se ha estudiado hasta la fecha.

Dado que la cepa B6.Y^{DOM} produce en general menores niveles de esteroides y a que no se sabe nada sobre la acción del IGF-I en esta especie, consideramos relevante evaluar el efecto de este factor sobre la producción de T y AD en el ovario XX y XY de los 10 a los 14 dpp intervalo en el que se llevan a cabo las etapas tempranas de la foliculogénesis.

Con base en los antecedentes mencionados se plantea la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS:

El IGF-I tiene un efecto sinérgico con la FSH y la LH para incrementar la producción de andrógenos como la testosterona y la androstendiona en los ovarios XX y XY, al igual que en otras especies de mamíferos estudiados. Este efecto podría ser mayor en los ovarios XX que en los XY debido a que la ausencia de células germinales primordiales en la médula provocan un desarrollo anormal del tejido productor de esteroides sexuales en la zona medular de los ovarios XY.

IV. OBJETIVOS

1) Determinar si el factor de crecimiento semejante a insulina tipo I en esta especie tiene un efecto sinérgico con la hormona estimulante del folículo en la síntesis de androstendiona y testosterona durante el desarrollo folicular temprano en los ovarios XX y XY de 10 a 14 *días postpartum* en el ratón B6.Y^{DOM}.

2) Evaluar si existen diferencias en la producción de andrógenos en los ovarios XX y XY cultivados con y sin hormona luteinizante a los 14 *días postpartum*, ya que a los 12 *días postpartum* la hormona luteinizante no tiene ningún efecto en la síntesis de androstendiona y testosterona.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

Todos los reactivos empleados en el presente estudio, fueron grado analítico. Las soluciones empleadas se describen en el apéndice (pag 54-56).

El material empleado para el cultivo de órganos por rotación se esterilizó 30 minutos en ciclo seco a 115 lb/in².

5.2 Animales

Los ratones hembras de la cepa B6.Y^{DOM} de 10 a 14 dpp empleados en el presente estudio se obtuvieron de la colonia de la Dra. Irma Villalpando Fierro, ubicada en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los ratones se mantuvieron en períodos de luz y oscuridad de 12 h (6:00 a.m. a 6:00 p.m), a una temperatura de 24-25°C, se alimentaron con la Formula 8626 ("Harland Tekland") y agua filtrada por osmosis inversa y acidificada. Las hembras XY se obtuvieron de la siguiente manera: cada macho B6.Y^{DOM} (50-180 dpp) se apareó con tres hembras B6 (50-100 dpp) durante toda la noche y se buscó la presencia de tapones de copulación a la mañana siguiente. El día que se vió el tapón se definió como día 0 dg mientras que el día del parto se definió como día 0 pp.

5.3 Determinación del sexo cromosómico

a). Obtención de las muestras biológicas

Los ratones se anestesiaron 1 min en una cámara de plástico saturada con éter etílico (Baker). Se obtuvieron 2 µL de sangre periférica de la vena media caudal con una micropipeta graduada de 5 mL de borosilicato (Corning Glass Works). La sangre se colocó en

una membrana para hibridación cargada positivamente (Gene Screen Plus Membrane, de Dupont); y se horneó 2 h a 80°C al vacío, después se desnaturalizó 1 h en una solución de NaOH 0.4 N y se neutralizó con Tris 1 M pH 7.0, por 1 h a temperatura ambiente.

b). Marcado de la sonda del cromosoma Y

Se marcaron 300 ng de la sonda 145SC5 dirigida contra secuencias repetidas del cromosoma Y (Nishioka & Lamothe, 1986) con α -dATP³² por el método de Random Primer con un estuche de Gibco B.R.L., siguiendo el protocolo proporcionado por la compañía. La sonda se desnaturalizó en baño María 5 min y se enfrió inmediatamente en hielo. Se añadió a la sonda 2 μ L de dCTP, dGTP, dTTP, 15 μ L del amortiguador del Random Primer, 5 μ L (50 microcuries) de α -dATP³² y 49 μ L de agua destilada, se incubó 2 h y la reacción se detuvo con 5 μ L del amortiguador de paro. Se agregó TEN para tener un volumen final de 160 μ L y se almacenó en frascos especiales hasta su uso a -20°C. La radioactividad incorporada expresada en cpm se cuantificó en un contador de centelleo líquido (Technical Associates, Modelo PUG1AB).

c). Hibridación puntual

El sexo de las hembras XY de la cepa B6.Y^{DOM} de 10 a 14 dpp se detectó a través de la técnica de hibridación puntual (Nishioka & Lamothe, 1986; Nishioka, 1988). La membrana se hibridó con 1×10^6 cpm de la sonda (donada por el Dr. Yutaka Nishioka de McGill University, Canadá), 24 h a 42°C. Después se lavó 3 veces con SSC 1X a 60°C en agitación y se expuso a una película (X-OMAT de Kodak) en un cassette a -70°C, que se reveló 4 días

después. Sólo las muestras que tienen las secuencias específicas del cromosoma "Y" son positivas a esta prueba (Figura 4).

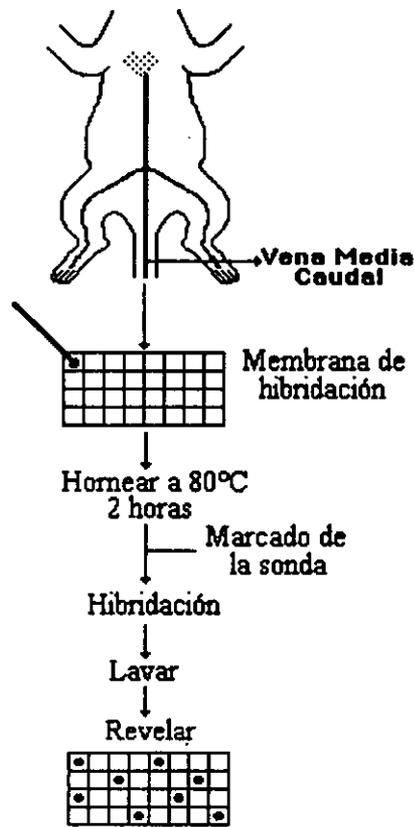


Figura 4. Determinación del sexo genómico de las hembras XY por hibridación puntual.

5.4 Aislamiento y cultivo por rotación de los ovarios

Ratones hembras de la cepa B6.Y^{DOM} de 10 a 14 dpp fueron sacrificados por dislocación cervical, su abdomen se limpió con benzal-etanol 1:1 y se realizaron dos cortes en "V" en la región central. Se localizaron los riñones, ya que en el polo inferior de estos se ubican los ovarios, unidos a los oviductos. Estos órganos se aislaron y colocaron en una caja de Petri con medio de cultivo (apéndice pag 54). Posteriormente, bajo un microscopio estereoscópico (Modelo Stereo Zoom 6 Photo de Leica) se eliminó el tejido graso y los oviductos de cada uno de los ovarios. Estos se cortaron en 4 pedazos con un bisturí estéril y se colocaron en tubos estériles de vidrio Pyrex de 12x75 mm con 0.5 mL de medio de cultivo (apéndice pag

54). El tejido se incubó en una estufa de cultivo de National Heinicke, 24 h a 37°C y una atmósfera de 5% de bióxido de carbono empleando un cultivo rotatorio. Los tubos se almacenaron a -20°C para inactivar el metabolismo de los esteroides (Villalpando y col, 1993). En el sobrenadante de estos tubos se cuantificaron por RIA la androstendiona y la testosterona, mientras que el tejido ovárico se empleó en la detección de la actividad de la enzima 3β-HSD (Figura 5).

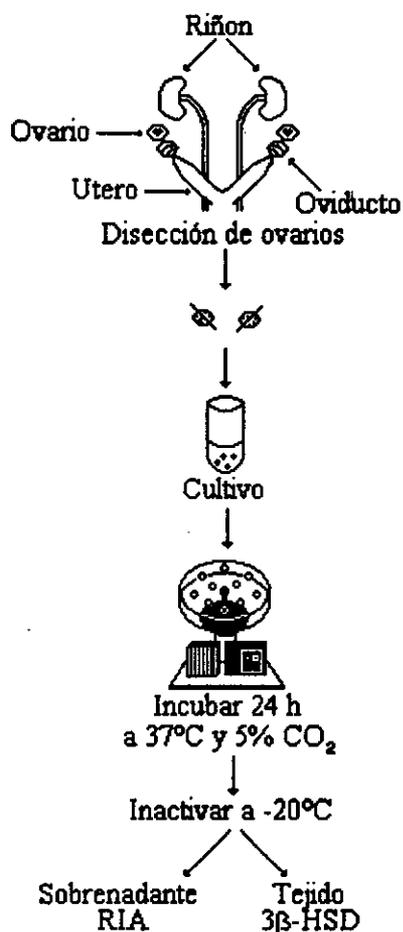


Figura 5. Esquema que ilustra la técnica de disección y cultivo de los ovarios B6.Y^{DOM}.

5.5 Radioinmunoanálisis

Todas las determinaciones hormonales realizadas en el presente estudio se hicieron por duplicado y se basan en el diseño general que a continuación se presenta:

Esquema general para RIA

No. TUBO	CONTENIDO
1 - 2	TC (Cuentas totales)
3 - 4	NSB (Unión no específica)
5 - 6	A (Unión máxima)
7 - 20	Curva estándar a concentraciones crecientes de 0.1 ng/ml a 10.0 ng/ml
21 → fin	Muestras experimentales

a). Estándares de testosterona

A partir de la solución madre de testosterona de 1 mg/ml (apéndice pag 55) se prepararon los estándares (de 0.1 ng/mL a 10 ng/mL) de la curva estándar.

b). Radioinmunoensayo de testosterona

Para esta determinación se empleó el estuche ImmunoChem™ Double Antibody testosterone de ICN Biomedicals, Inc. Diagnostic Division (California, U.S.A.). Se emplearon tubos de vidrio de 12x75 mm de borosilicato Fisherband de Fisher Scientific (PGC Scientific Maryland, U.S.A.).

Radioinmunoensayo de testosterona

No. TUBO	Buffer diluyente	MEM	Muestra	PBS	T- ¹²⁵ I	Primer Anticuerpo	Segundo Anticuerpo
1 - 2	---	---	---	---	500 µL	---	---
3 - 4	500 µL	50 µL	---	100 µL	"	---	100 µL
5 - 6	---	50 µL	---	"	"	500 µL	"
7 - 8	---	---	50 µL St1 T	"	"	"	"
9 - 10	---	---	" St2 T	"	"	"	"
11 - 12	---	---	" St3 T	"	"	"	"
13 - 14	---	---	" St4 T	"	"	"	"
15 - 16	---	---	" St5 T	"	"	"	"
17 - 18	---	---	" St6 T	"	"	"	"
19 - 20	---	---	" St7 T	"	"	"	"
21 → fin	---	---	50 µL	"	"	"	"

El contenido de los tubos fue mezclado con un agitador, se incubaron 2 h a 37°C en un baño María (Scientific Products Durabath™); transcurrido ese tiempo se adicionaron 100 µL del segundo anticuerpo, se agitaron y se incubaron durante 1 h a 37°C. Después los tubos se

centrifugaron a 2500 rpm, por 15 minutos a 4°C en una centrífuga GS6R de Beckman. Se decantó el sobrenadante de cada uno de los tubos (excepto el de los tubos 1 y 2) y se contó durante 1 min el precipitado en un contador gamma (Packard Auto - Gamma 5650).

c). Especificidad del anticuerpo anti-testosterona

El anticuerpo anti-testosterona es altamente específico para esta hormona esteroidea, ya que tiene una baja reacción cruzada para otros esteroides naturales como:

5 α -dihidrotestosterona	3.4 %
5 α -Androsten-3 β ,17 β -diol	2.2 %
11-oxotestosterona	2.0 %

d). Estándares de androstendiona

A partir de la solución madre de androstendiona de 1 mg/ml (apéndice pag 55) se prepararon los estándares de la curva de calibración (de 0.1 ng/mL a 10 ng/mL).

e). Radioinmunoensayo de androstendiona

Para esta determinación se empleó el estuche Coat-A-Count, Direct Androstendione, de Diagnostic Products Corporation (California, U.S.A.). Se emplearon tubos de vidrio de 12x75 mm de borosilicato Fisherband de Fisher Scientific (PGC Scientifics Maryland, U.S.A.).

Radioinmunoensayo de androstendiona

No. TUBO	CALIBRADOR	MUESTRA	AD- ¹²⁵ I
1 - 2	---	---	1.0 mL
3 - 4	100 μ L	---	"
5 - 6	100 μ L	---	"
7 - 8	---	100 μ L St1 A	"
9 - 10	---	" St2 A	"
11 - 12	---	" St3 A	"
13 - 14	---	" St4 A	"
15 - 16	---	" St5 A	"
17 - 18	---	" St6 A	"
19 - 20	---	" St7 A	"
21 \rightarrow fin	---	100 μ L	"

Todos los tubos se agitaron en vortex y se incubaron 2 h a temperatura ambiente, después se decantó el sobrenadante (excepto los tubos 1 y 2) y se contó durante 1 min el precipitado de cada uno en un contador gamma (Packard Auto - Gamma 5650).

f). Especificidad del anticuerpo anti-androstendiona

El anticuerpo anti-androstendiona es altamente específico, con una baja reacción cruzada para otros esteroides naturales como:

Testosterona	1.49 %
5 α -Dihidrotestosterona	0.212 %
Progesterona	0.160%

5.6 Detección de la actividad de la enzima 3 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa

Se aislaron las gónadas del ratón B6.Y^{DOM} de 10 a 14 dpp y se incluyeron en Tissue-Tek (Lab's Milles). Se hicieron cortes de 10 μ m de grosor con un microtomo de congelación (Cryo-Cut Microtome de American Optical Corporation). Los cortes se incubaron durante 1 h a 37°C en cajas Koplín con solución de incubación (apéndice pag 55). Se emplearon 2 cajas Koplín, una caja sin DHEA como control y la otra con 2 mg de DHEA. Los cortes se lavaron con agua destilada y se fijaron con formalina neutra 15 minutos (apéndice pag 56). Después se enjuagaron con PBS 0.05 M tres veces (apéndice pag 56). Por último, las preparaciones se montaron en glicerol (Sigma Chemical) y se fotografiaron las muestras en un microscopio Optiphot-2 de Nikon. El siguiente esquema ilustra esta metodología (Figura 6).

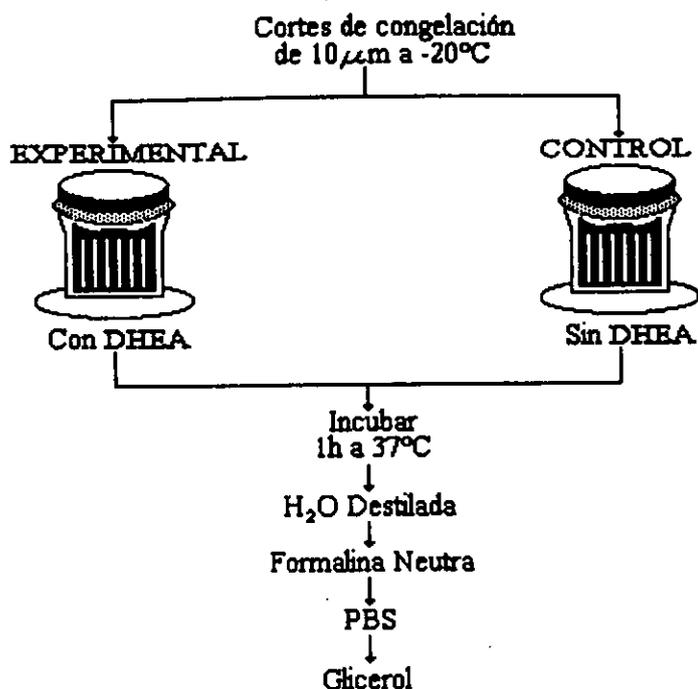


Figura 6. Esquema en el que se ilustra el método experimental empleado en la detección de la actividad de la 3β-HSD en cortes de congelación en los ovarios B6.Y^{DOM}.

5.7 Análisis estadístico de los datos

Los datos se analizaron estadísticamente por la prueba "t" de Student y el análisis de varianza se realizó por Bonferroni T-test. Estas pruebas se realizaron con el programa Primer of biostatics: the program de Stanton A. Glantz. Version 3.02 Copyright ©. 1992 por McGraw-Hill. INC. Con intervalos de confianza de 0.05, 0.01 y 0.001.

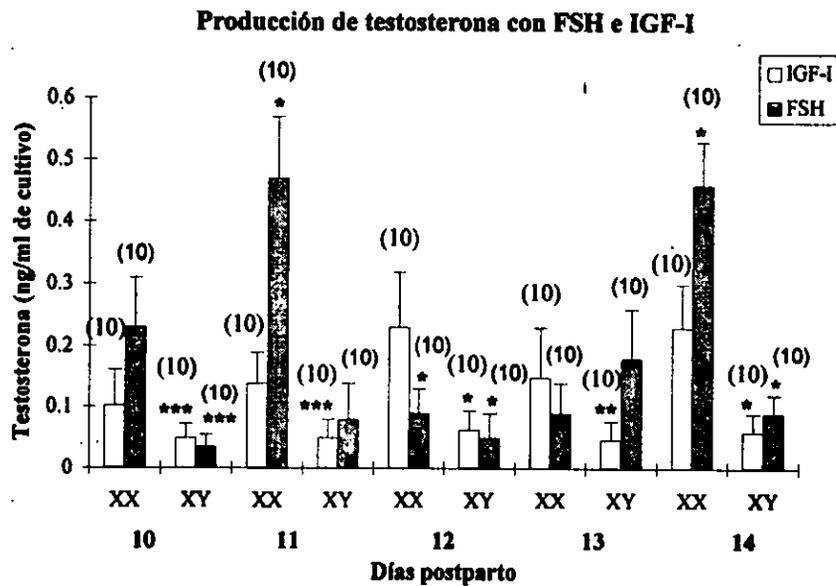
VI. RESULTADOS

6.1 Efecto de la FSH y del IGF-I sobre la producción de andrógenos

a). Testosterona

La gráfica 1 muestra el efecto de la hormona estimulante del folículo y del IGF-I sobre la síntesis de testosterona en los ovarios XX y XY. Se observa que a los 10 *días postparto*, los ovarios XX producen más testosterona que los ovarios XY con y sin hormona estimulante del folículo (FSH). A los 11 *días postparto* los ovarios XX cultivados con FSH incrementan la producción de testosterona tres veces comparados con los ovarios XX cultivados sin FSH, mientras que los niveles presentes en el ovario XY cultivados con FSH son un poco más altos (pero no son estadísticamente significativos) a los observados a los 10 *días postparto*. Los niveles de testosterona en el ovario XY cultivado sin FSH es similar a los observados a los 10 *días postparto*. A los 12 dpp los ovarios XX cultivados con FSH producen menos testosterona que aquellos cultivados sin FSH. Los niveles de testosterona observados a esta edad en el ovario XY con y sin FSH son un poco más altos (aunque no son estadísticamente significativos) que los detectados a los 10 *días postparto*. A los 12 y a los 13 *días postparto* los ovarios XX cultivados con FSH disminuyen la producción de testosterona, comparados con los niveles observados a los 11 *días postparto*, mientras que los ovarios XY de 13 *días postparto* cultivados con FSH incrementan la síntesis de testosterona tres veces comparado con el ovario XY cultivado sin FSH. A los 14 *días postparto* el ovario XX cultivado con FSH incrementa la producción de testosterona, mientras que en el ovario XY la producción de esta hormona sin FSH, se mantuvo con relación a la producida a los 13 *días postparto*. En resumen, podemos observar que el ovario XX cultivado con la hormona estimulante del folículo tuvo su mayor producción de testosterona a los 11 y 14 *días postparto*, mientras que el

XY la presentó a los 13 *días postparto*. Por otro lado en ausencia de la hormona estimulante del folículo el ovario XX produjo más testosterona a los 12 y 14 *días postparto* y el ovario XY lo hizo a los 12 *días postparto*.

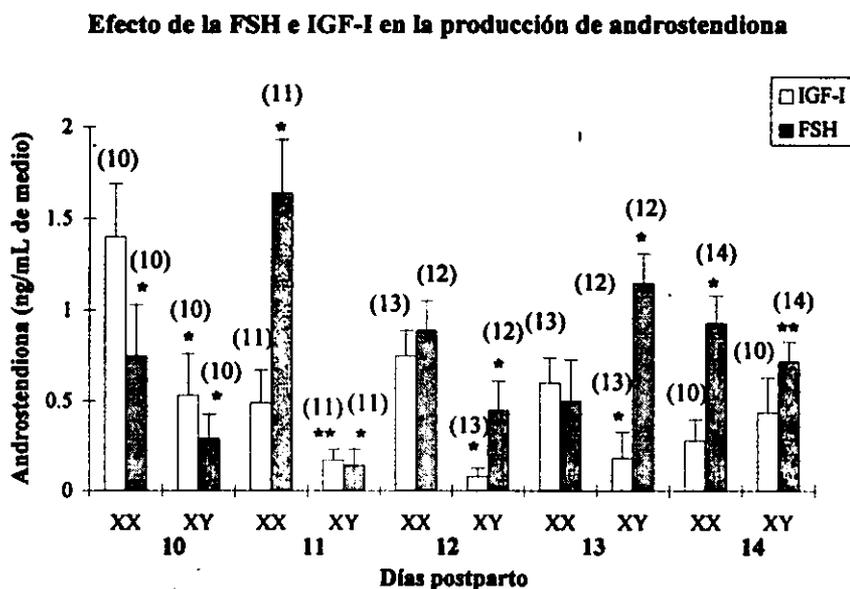


Gráfica 1. Producción de testosterona en los ovarios XX y XY de 10-14 *días postparto* cultivados con y sin hormona estimulante del folículo (FSH) en presencia del factor de crecimiento semejante a insulina tipo I (IGF-I). Las columnas blancas representan los ovarios cultivados con IGF-I y sin FSH mientras que las grises los ovarios cultivados con IGF-I y FSH. Los números entre paréntesis indican el número de pares de ovarios que fueron analizados y las barras representan el promedio más la desviación estándar. *, ** y *** indican que existen diferencias estadísticamente significativas de estos grupos con el grupo control (ovarios XX incubados con IGF-I y sin FSH a cada edad) a intervalos de $P < 0.001$, $P < 0.01$ y $P < 0.05$ respectivamente.

b). Androstendiona

En la gráfica 2 se muestra la concentración de androstendiona producidas en los ovarios XX y XY cultivados con y sin hormona estimulante del folículo. Se observó que a los 10 *días postparto* el ovario XX cultivado sin hormona estimulante del folículo (FSH) produce más androstendiona que el ovario XY. La adición de FSH a esta edad no eleva la producción de androstendiona en el ovario XX ni en el XY. A los 11 *días postparto*, los niveles de androstendiona en el ovario XX sin FSH disminuyen su valor al 30% de los niveles observados a los 10 *días postparto*. Sin embargo, los niveles de esta hormona se incrementan en los cultivos de los ovarios XX realizados con FSH. En los ovarios XY de la misma edad cultivados con y sin FSH, los niveles de androstendiona son menores (un 50 % y un 30% respectivamente) a los observados en el día 10 *días postparto*. A los 12 *días postparto* los niveles de androstendiona en los ovarios XX cultivados con y sin FSH son similares, mientras que la presencia de FSH parece tener un efecto estimulante en la síntesis de androstendiona en el ovario XY incrementando la síntesis de esta hormona tres veces comparado con el ovario XY cultivado sin FSH. A los 13 *días postparto* la producción de androstendiona no disminuye significativamente en los ovarios XX cultivados con y sin FSH comparados con los niveles detectados a los 12 *días postparto*. Sin embargo, el ovario XY cultivado con FSH incrementa la producción de androstendiona 5 veces comparado con los cultivos realizados sin FSH. El efecto sinergista del IGF-I con la hormona estimulante del folículo sobre la producción de androstendiona se observa a los 11 y a los 14 *días postparto* en los ovarios XX, y a los 12 y 13 *días postparto* en los ovarios XY. A los 14 *días postparto* los valores de androstendiona son bajos en ausencia de gonadotropina. En el ovario XY de 14 *días postparto* cultivado con FSH, los niveles de androstendiona producidos son aproximadamente el 50% de los observados en

el ovario XX. En el ovario XY la producción hormonal detectada sin gonadotropinas es similar a la observada en el ovario XX cultivado sin FSH.

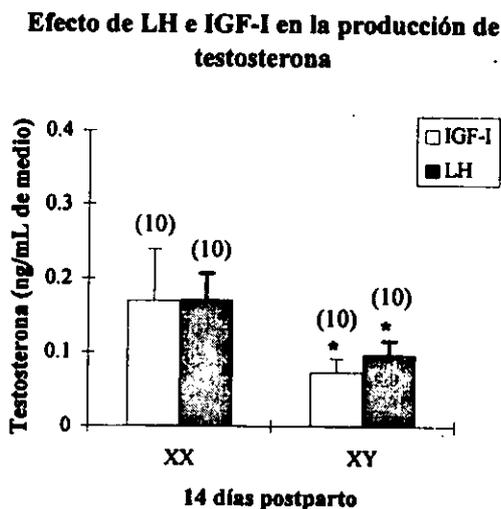


Gráfica 2. Producción de androstendiona en los ovarios XX y XY de los 10-14 días *postparto* en presencia del factor de crecimiento semejante a insulina tipo I (IGF-I) con y sin hormona estimulante del folículo (FSH). Las columnas blancas representan la incubación de los ovarios con IGF-I y sin FSH mientras que las grises el cultivo de los ovarios con IGF-I y FSH. Los paréntesis indican el número de pares de ovarios que fueron analizados y las barras representan el promedio más la desviación estándar. * y ** indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre esos grupos y el grupo control (ovarios XX incubados con IGF-I y sin FSH a cada edad) a intervalos de $P < 0.001$ y $P < 0.01$ respectivamente.

6.2 Acción de la LH y del IGF-I en la síntesis de andrógenos

a). Testosterona

El efecto de la hormona luteinizante (LH) y del IGF-I, se evaluó en ovarios XX y XY a los 14 días *postparto* (Gráfica 3). Los resultados muestran que a esta edad, los ovarios XX producen mayor cantidad de testosterona que los ovarios XY tanto en presencia como en ausencia de LH. Sin embargo, no existen diferencias significativas en la producción de testosterona entre los ovarios XX y XY a los 14 días *postparto* con y sin LH.

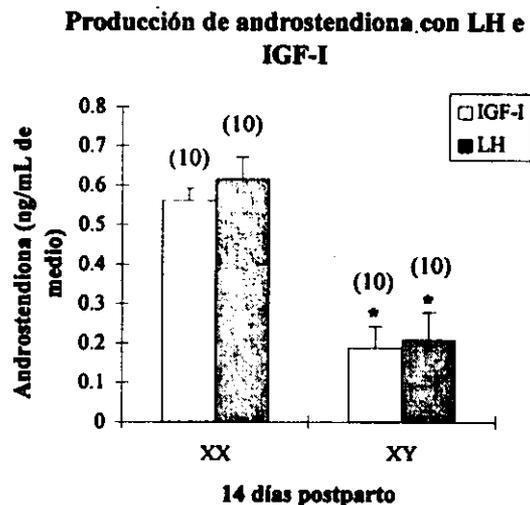


Gráfica 3. Producción de testosterona en los ovarios XX y XY a los 14 días *postparto* con y sin hormona luteinizante (LH) y en presencia del factor de crecimiento semejante a insulina tipo I (IGF-I). Las columnas blancas representan la producción de testosterona en los ovarios cultivados con IGF-I y sin LH y las grises la producida con IGF-I y LH. Los números entre paréntesis indican el número de pares de ovarios que fueron analizados y las barras representan el promedio más la desviación estándar. * indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre esos grupos y el grupo control (ovarios XX cultivados con IGF-I y sin LH), para $P < 0.001$

b). Androstendiona

También se evaluó el efecto de la hormona luteinizante (LH) y el IGF-I sobre la producción de androstendiona en los ovarios XX y XY a los 14 *días postparto* (Gráfica 4). Podemos observar que los ovarios XX producen aproximadamente el doble de androstendiona que los ovarios XY cultivados con y sin LH. No existen diferencias significativas en la producción de androstendiona entre los ovarios XX y XY cuando se cultivan con y sin LH.

Comparando la producción de testosterona y androstendiona en los ovarios XX y XY a los 14 *días postparto* cultivados con y sin hormona luteinizante se observa que ambos ovarios producen mayor cantidad de androstendiona.



Gráfica 4. Producción de androstendiona por los ovarios XX y XY a los 14 *días postparto* en presencia del factor de crecimiento semejante a insulina tipo I (IGF-I) y con y sin la hormona luteinizante (LH). Las columnas blancas representan la producción de androstendiona en los ovarios cultivados con IGF-I y sin LH mientras que las grises la de los ovarios cultivados con IGF-I y LH. Los números entre paréntesis indican el número de pares de ovarios que fueron analizados y las barras representan el promedio más la desviación estándar. * indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre esos grupos y el grupo control (ovarios XX cultivados con IGF-I y sin LH) para $P < 0.001$.

6.3 Detección histoquímica de la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

La actividad de esta enzima, se demostró en cortes de ovarios que fueron incubados durante 24 h en rotación. La actividad de la enzima se observó en las células de la granulosa y en las células de la teca de los ovarios XX y XY. A los 14 *días postparto* la actividad de esta enzima se localiza principalmente en el tejido intersticial y alrededor de los folículos en las células de la granulosa del ovario XX (Figura 7). La mayor actividad se detectó en los cordones medulares estériles y en las células de la teca en los ovarios XY a los 14 *días postparto* (Figura 8).

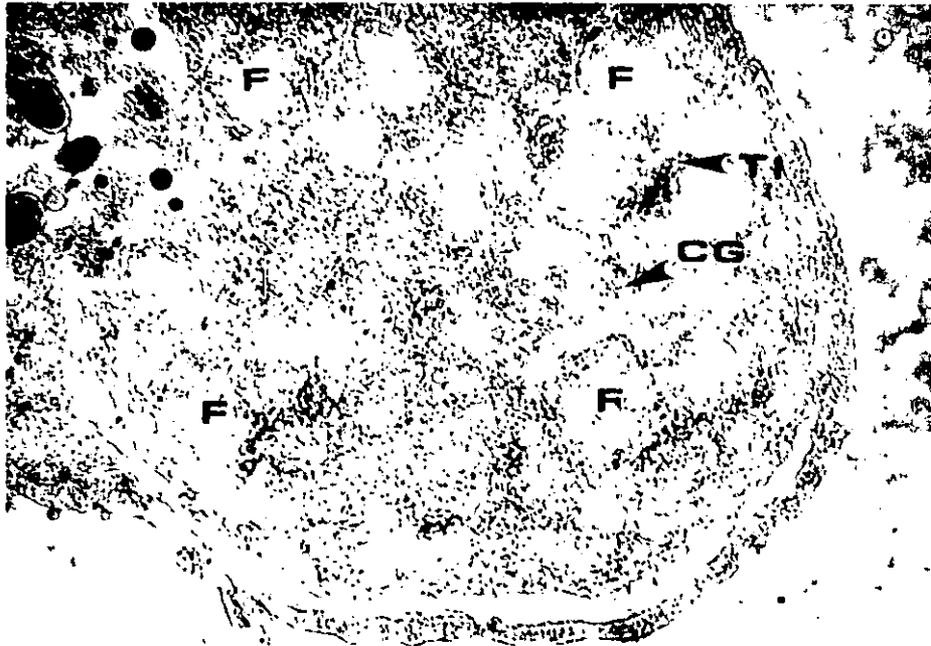


Figura 7. Corte transversal de un ovario XX de 14 *días postparto*, donde se muestra la actividad de la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, localizada principalmente en el tejido intersticial (TI) y alrededor de los folículos (F) en las células de la granulosa (CG).

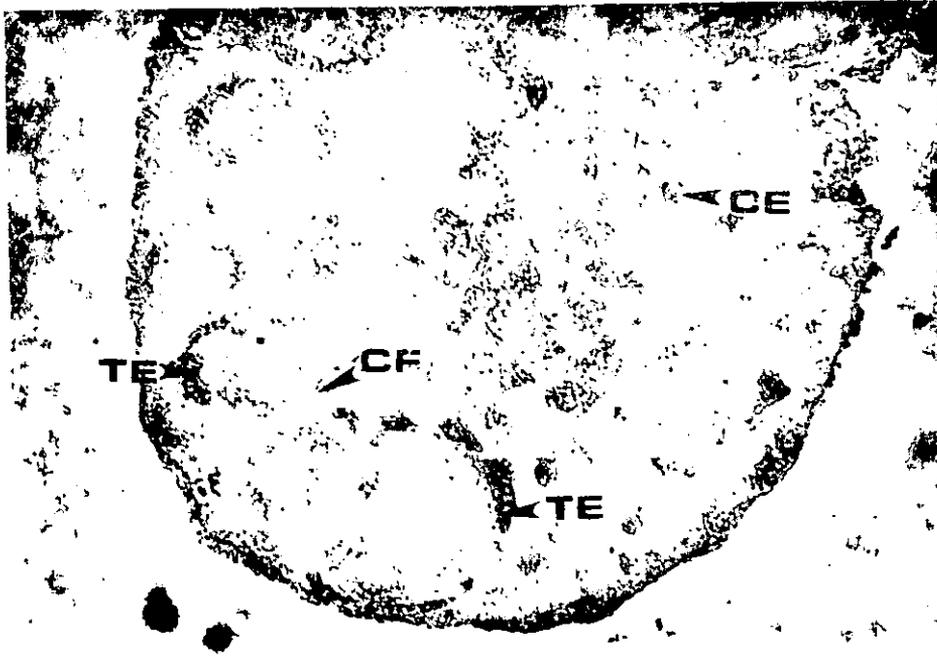


Figura 8. Corte transversal de un ovario XY de 14 *días postparto* donde se muestra la actividad de la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa detectada principalmente en los cordones medulares estériles (CE). Se observa también la actividad en la teca (TE) y alrededor de las células foliculares (CF).

6.4 Organización histológica del ovario B6.Y^{DOM}

En la figura 9 se muestra un ovario XY de 14 *días postparto*, en el que se muestran folículos en diferentes etapas de desarrollo localizados en la corteza y en los cordones estériles en la zona medular.

La figura 10 muestra muestra un ovario XX de 14 *días postparto* en el que se observan folículos primarios y folículos secundarios distribuidos en todo el ovario.

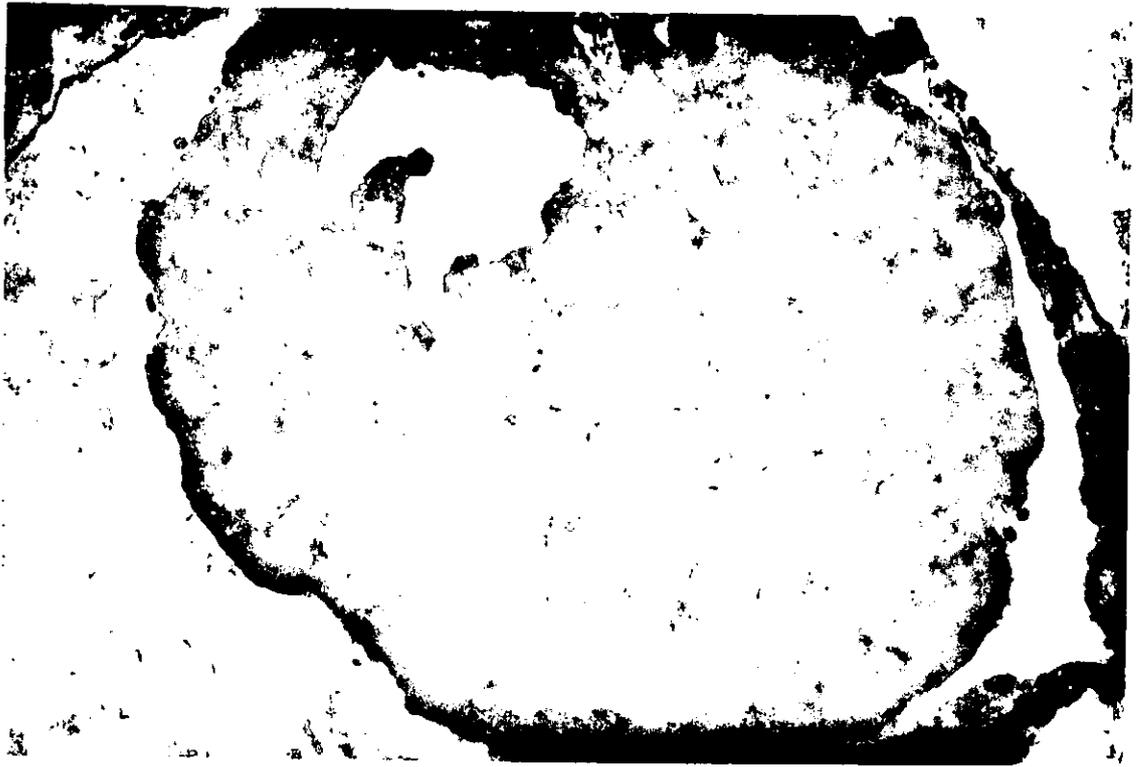


Figura 9. Fotografía de un ovario XY de 14 *días postparto*, donde se muestran los folículos (F) en diferentes etapas de desarrollo ubicados en la corteza (C) y los cordones estériles (CE) en la zona medular.

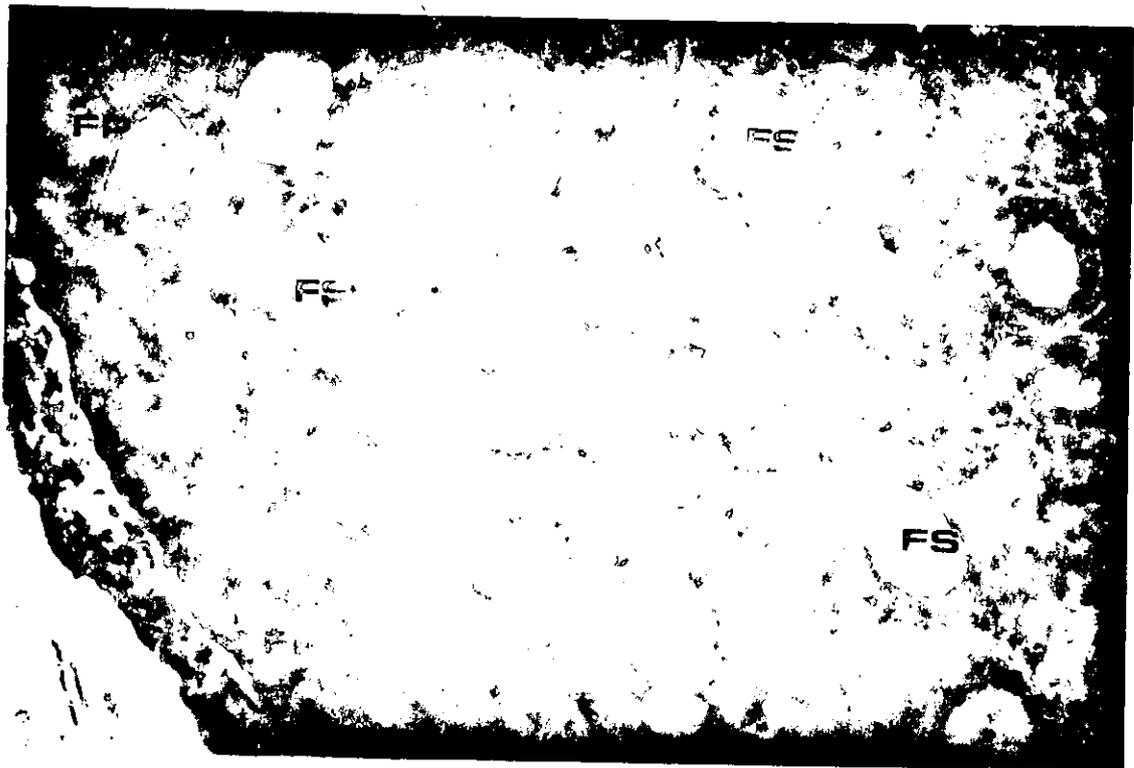


Figura 10. Fotografía que muestra un ovario XX de 14 *días postparto* donde se observan folículos primarios (FP) y folículos secundarios (FS) distribuidos en todo el ovario.

VII. DISCUSIÓN

En la presente investigación se observó que el IGF-I sinergiza con la LH y FSH e incrementa los niveles de androstendiona (AD) y testosterona (T) sintetizados por los ovarios XX y XY pero no en todas las etapas, en algunas este péptido parece tener un efecto inhibitorio. Estos resultados están de acuerdo con los descritos en otros estudios, en donde se observa un incremento de la biosíntesis de andrógenos en las células de la teca, así como la de estrógenos en las células de la granulosa en otras especies de vertebrados (Adashi y col, 1985a; b; Davoren y col, 1985). El IGF-I ejerce una influencia estimulante en la producción de T sólo a los 11 y 14 dpp. En algunas de las etapas investigadas, en los ovarios incubados con IGF-I solo se ve un efecto inhibitorio en la producción de T lo cual probablemente depende del tipo de folículos que se encuentran en el ovario al momento de realizarse el estudio. Esto podría estar directamente relacionado a la presencia de receptores en las células de la teca y/o de la granulosa. Ya que se ha visto que la presencia de estas moléculas es necesaria para que el IGF-I ejerza su efecto biológico en las células (Baxter & Martín, 1989).

Un aspecto interesante de la función endocrinológica del ovario XY es la baja capacidad de respuesta al efecto estimulante de las gonadotropinas. Los bajos niveles de AD observados en los ovarios XY cultivados en presencia de FSH, aparentemente no se deben al número de receptores para gonadotropinas presentes ya que en estudios previos se ha demostrado que el número de receptores a FSH y LH en los ovarios XX y XY son similares, lo que sugiere que el control de la producción hormonal podría ser regulado a nivel de las proteínas cinasas. (Amleh y col, 1996).

Por otra parte, de estudios previos se sabe que el IGF en el ratón es producido en las células de la teca (Villalpando y col, 1993), contrariamente a lo demostrado en otras especies de

roedores como la rata en la cual este factor se produce en las células de la granulosa. En la mayoría de roedores, el número de células de la teca en las dos primeras semanas del desarrollo postnatal es muy reducido y por lo tanto la producción de T también (Mannan & O'Shaughnessy, 1988;1991; Richards y col, 1987). Así mismo, la expresión del RNAm de la enzima 17α -hidroxilasa que controla la producción de andrógenos como la T y la AD se expresa después a los 14 dpp en el ovario XY (Pérez Vantine, 1997), esto sugiere que un posible nivel de regulación del IGF-I sea la expresión de las enzimas que participan en la biosíntesis de andrógenos.

En el ratón, durante el desarrollo folicular temprano se ha visto que el principal andrógeno sintetizado en el ovario es la AD (Mannan & O'Shaughnessy, 1988;1991). Nuestros resultados muestran que el IGF-I tiene un efecto estimulante en la producción de AD a los 13 dpp en el ovario XY. Así mismo, es posible que en el control de la foliculogénesis temprana en el ratón también intervengan otros péptidos como la hormona inhibidora de los conductos de Müller (Münsterberg & Lovell-Badge, 1991; Pérez Vantine, 1997).

Taketo y col. (1989), postulan que la muerte precoz de los ovocitos en los cordones medulares de los ovarios XY evita la formación folicular en esta área, lo que lleva a una diferenciación anormal de las células esteroideogénicas, sugiriendo que la alteración en esta vía del desarrollo puede ser responsable de las funciones endócrinas anormales del ovario XY y proponen que en el ovario XX, el crecimiento y la atresia folicular en los cordones sexuales medulares puede ser crítico para el desarrollo de las funciones ováricas normales.

La pérdida de los ovocitos en la fase embrionaria a los 16 dg (Taketo y col, 1989), provoca que las células pre-granulosa del ovario XY se diferencien a células luteales, las cuales producen principalmente P_4 . (Villalpando, datos sin publicar). Merchant-Larios en 1976

propuso que el desarrollo neonatal del ovario y la atresia folicular en la médula es esencial para el establecimiento de un perfil esteroideogénico normal y planteo que la presencia de ovocitos durante la vida fetal puede ser requerida para la diferenciación parcial de las células pre-granulosas. Las escasas células intersticiales esteroideogénicas en el ovario XY pueden explicar la insensibilidad de este ovario a las gonadotropinas para la síntesis de T a los 14 dpp; no obstante, las células intersticiales esteroideogénicas probablemente derivadas de los folículos atresicos de la corteza, están presentes en el ovario XY en la pubertad y por lo tanto la insensibilidad a las gonadotropinas pudiera residir en las células esteroideogénicas XY (Villalpando y col, 1993).

Taketo y col, 1989 proponen que la infertilidad de las hembras XY se debe a una anomalía en los ovarios XY. Se debe mencionar que las hembras XY que presentan una deleción en la región Sry del cromosoma Y son fértiles, lo que sugiere que la expresión del gen Sry en cierto punto del desarrollo puede interrumpir el establecimiento de las funciones ováricas normales de la región medular en las hembras XY (Lovell & Robertson, 1990). También es importante mencionar que las hembras XY a los 25 dpp o mayores, pueden ovular cuando son tratadas con gonadotropina de yegua preñada seguida de hCG (Taketo y col, 1989; Eicher & Washburn, 1986). Por lo que una de las posibles causas de infertilidad es la función endócrina anormal del ovario XY. Aunque en el presente estudio no se investigó el mecanismo de acción del IGF-I, el efecto estimulante del IGF-I podría deberse a que quizá activa otros mecanismos en los cuales podrían estar involucrados otros segundos mensajeros y la vía del fosfatidil inositol que pudieran estar actuando como segundos mensajeros; existen algunos estudios que apoyan esta proposición (Dimino & Snitzer, 1986; Ireland, 1987). Sin embargo, es claro que el IGF-I tiene un efecto inhibitor y estimulante sobre la biosíntesis de

andrógenos; esto es interesante dado que este factor controla la biosíntesis de andrógenos en las fases en que los folículos ováricos están constituidos por células de la teca ya que hay pocas células foliculares.

Una de las autocríticas a los presentes experimentos es que no conocemos la concentración endógena del IGF-I en el ovario, lo que nos daría una idea más clara, si realmente los niveles intraováricos varían en cada una de las etapas estudiadas debido a que no se produce la misma cantidad de IGF-I en las edades investigadas. En estudios previos se demostró que el IGF-I se empieza a sintetizar en etapas muy tempranas desde el primer día de nacimiento en la cepa B6.Y^{DOM} (Villalpando y col, 1993). Sin embargo, no se sabe que tipo celular expresa el mRNA de este factor en el ratón.

Recientemente se publicó que existen diferencias en la regulación del receptor tipo I del IGF-I en esta especie. Así mismo, se observó que la proteína de unión 2, así como, su mRNA se localizó en las células de la granulosa de todos los tipos de folículos del ratón (Adashi y col, 1997). Con base en estos resultados, es claro que no se pueden extrapolar los hallazgos encontrados en la rata, ya que aunque sean muy cercanos filogenéticamente existen diferencias específicas de especie. Ya que la rata y el ratón difieren en la capacidad de respuesta a FSH y por consiguiente en el proceso de esteroidogénesis, el efecto amplificador del IGF-I en presencia de FSH, así como la actividad antigonadotrópica es mediada por las proteínas receptoras (Adashi y col, 1997).

La cuantificación de andrógenos realizada por RIA en esta investigación presenta desviaciones estándar grandes cuando se empleó el método en fase sólida, comparadas con las obtenidas por el método en fase líquida. Lo que indica que este último método es más preciso al realizar las cuantificaciones. A pesar de que la cuantificación es directa en ambos métodos,

las diferencias encontradas pueden deberse a errores de tipo aleatorio (cambio en la precisión) debidos al analista ya que en el método en fase sólida el anticuerpo α -AD se encuentra unido a la pared del tubo de polietileno lo cual tal vez al decantar el líquido radioactivo, no se haya realizado de manera eficiente quedando residuos de este en el tubo, lo que incrementaría el valor real de las muestras evaluadas. En fase líquida la reacción T/ α -T se lleva a cabo en el medio lo cual al centrifugar y decantar se disminuye el riesgo de que quede radioactividad inespecífica, por lo que se requiere mucha práctica para lograr decantar perfectamente y obtener un valor real del andrógeno cuantificado.

En los grupos en donde la desviación estándar es muy grande, habría que aumentar el número de muestras y realizar un decantamiento más cuidadoso para de esta manera tener una idea más real de la capacidad sinérgica que tiene el IGF-I con las gonadotropinas en la producción de andrógenos en especial la síntesis de androstendiona.

Finalmente en este estudio se demuestra que el IGF-I tiene un papel dual como estimulador e inhibidor de la síntesis de andrógenos en un período del desarrollo ovárico en el que este órgano está constituido por folículos primarios y secundarios.

VII. CONCLUSIONES

1. El factor de crecimiento semejante a insulina tipo I sinergiza con la hormona estimulante del folículo y la hormona luteinizante e incrementa la producción de testosterona y androstendiona.
2. El factor de crecimiento semejante a insulina tipo I parece tener un efecto dual inhibitor/estimulador en la producción de andrógenos, en el ovario B6.Y^{DOM}, lo cual está relacionado con etapas particulares de la foliculogénesis temprana en esta especie.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Adashi EY, Resnick CE, Svoboda ME & Van WJJ. 1985a. Somatomedin-C synergizes with follicle stimulating hormone in the acquisition of progesterone biosynthetic capacity by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 116:2135-2142.

Adashi EY, Resnick CE, Brodie AMH, Svoboda ME & Van WJJ. 1985b. Somatomedin-C mediated potentiation of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 117:2313-2320.

Adashi EY, Resnick CE, Hernández ER, Svoboda ME & Wyk JJV. 1988. Characterization and regulation of a specific cell membrane receptor for somatomedin-C/insulin-like growth factor I in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 122:194-201.

Adashi EY, Resnick CE, Hernández ER, Marjorie E, Hoyt SE, Clemmons DR, Lung PK & Van WJJ. 1989. Rodent studies on the potential relevance of insulin-like growth factor (IGF-I) to ovarian physiology. In: *Growth factors and the ovary*. Anne N. Hirshfield (ed). Plenum Press, New York.

Adashi EY, Resnick CE & Hurwitz A. 1992. The ovarian IGF system. *Growth Regul*. 2:10-15.

Adashi EY, Resnick CE, Payne DW, Rosenfeld RG, Matsumoto T, Hunter MK, Gargosky SE, Zhou J & Bondy CA. 1997. The mouse intraovarian insulin-like growth factor I system: Departures from the rat paradigm. *Endocrinology*. 138:1881-1890.

Amleh A, Ledee W, Saeed J & Taketo T. 1996. Competence of oocytes from the B6.Y^{DOM} sex-reversed female mouse for maturation, fertilization, and embryonic development in vitro. *Dev. Biol*. 178:263-275.

Baker TG. 1963. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc. R. Soc. London, B*. 158:417-433.

Baxter RC & Martín JL. 1989. Binding proteins for insulin-like growth factors: structure, regulation and function. *Prog. Growth Fact. Res*. 1:49-68.

Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN & Fellow M. 1990. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*. 348:448-450.

Bjersing L & Cartensen H. 1962. The role of the granulosa cell in the biosynthesis of ovarian steroid hormones. *Biochem. Biophys. Acta* 86:639-640.

Bjersing L. 1978. Maturation, morphology and endocrine function of the follicular wall in mammals. In: *The vertebrate ovary*. Jones JE (ed). New York. Plenum. 181-214.

- Byskov AG & Lintern-Moore S. 1973. Follicle formation in the immature mouse ovary: the role of the rete ovarii. *J.Anat.* **116**:207-217.
- Byskov AG. 1974. Does the rete ovarii act as a trigger for the onset of meiosis? *Nature.* **252**:396-397.
- Byskov AG. 1978. The anatomy and ultrastructure of the rete system in the fetal mouse ovary. *Biol. Reprod.* **19**:720-735.
- Channing CP & Seymour JF. 1970. Effects of dibutyl cyclic-3',5'-AMP and other agents upon luteinization of porcine granulosa cells in culture. *Endocrinology.* **87**:165-169.
- Channing CP & Kammerman. 1974. Binding of gonadotropins to ovarian cells. *Biol. Reprod.* **10**:179-198.
- Chappel SC & Selker F. 1979. Relation between the secretion of FSH during the periovulatory period and ovulation during the next cycle. *Biol. Reprod.* **21**:347-352.
- Daughaday WH & Rotwein P. 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endoc. Rev.* **10**:68-91.
- Davoren JB, Hsueh AJW & Li CH. 1985. Somatomedin-C augments FSH-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Am. J. Physiol.* **249**:E26-E33.
- Davoren JB & Hsueh AJW. 1986a. Growth hormone increases ovarian levels of immunoreactive somatomedin C/insulin-like growth factor I in vivo. *Endocrinology.* **118**:888-890.
- Davoren JB, Kasson BG, Li CH & Hsueh AJW. 1986b. Specific insulin-like growth factor (IGF) I- and II-binding sites on rat granulosa cells: relations to IGF action. *Endocrinology.* **119**:2155.
- De Chaira TM, Efstratiadis A & Robertson EJ. 1990. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insuline-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature.* **345**: 78-80.
- D'Ercole AJ, Stiles AD & Underwood LE. 1984. Tissue concentrations of somatomedin-C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**:935-939.
- Dimino & Snitzer J. 1986. Luteinizing hormone (LH) causes rapid increases in accumulation of inositol phosphates in granulosa from medium follicles of porcine ovaries. *Biol. Reprod.* **34** Suppl 1 168.
- Eicher EM, Washburn LL, Whitney JB & Morrow KE. 1982. *Mus poschiavinus* Y chromosome in the C57BL/6J murine genome causes sex reversal. *Science.* **217**: 535-537.

Eicher EM & Washburn LL. 1983. Inherited sex reversal in mice: identification of a new primary sex-determining gene. *J. Exp. Zool.* 228: 297-304.

Eicher EM & Washburn LL. 1986. Genetic control of primary sex determination in mice. *Ann. Rev. Genet.* 20:327-360.

Erickson DF & Ryan KJ. 1976. Stimulation of testosterone production in isolated rabbit thecal tissue by LH/FSH, dibutyryl cyclic AMP, PGF_{2α} and PGE₂. *Endocrinology.* 99:452-458.

Erickson GF & Hsueh AJW. 1978. Stimulation of aromatase activity by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocrinology.* 102:1275-1282.

Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA & Hofeditz C. 1985. The ovarian androgen producing cells: A review of structure/function relationships. *Endocr. Rev.* 6:371-399.

Faddy MJ, Jones EC & Edwards RG. 1976. An analytical model for ovarian follicle dynamics. *J. Exp. Zool.* 197:173-185.

Falck B. 1959. Site of production of oestrogen in rat ovary as studied by microtransplants. *Acta Physiol. Scand.* 47, Supp 163:1-101.

Fortune JE & Armstrong DT. 1977. Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrous rat follicles. *Endocrinology.* 100:1341-1347.

Guillman J. 1948. The development of the gonads in man, with a consideration of the role of fetal endocrines and histogenesis of ovarian tumors. *Contrib. Embryol.* 32:81

Goodman AL & Hodgen GD. 1983. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Rec. Prog. Horm. Res.* 39:1-73.

Gore LRE & Armstrong DT. 1988. Follicular steroidogenesis and its control. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E & Neill J (eds). Raven Press. New York. 331-385.

Gubbay J, Colligton J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P & Lovell BR. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature.* 346:245-250.

Hernández ER, Resnick CE, Svoboda ME, Wyk JJV, Payne DW & Adashi EY. 1988. Somatomedin-C/insulin-like growth factor I as an enhancer of androgen biosynthesis by cultured rat ovarian cells. *Endocrinology.* 122:1603-1612.

Hirshfield AN & Midgley AR Jr. 1978. The role of FSH in the selection of large ovarian follicles in the rat. *Biol. Reprod.* 19:606-611.

Hisaw FL. 1947. Development of the graafian follicle and ovulation. *Physiol. Rev.* 27:95-119.

Ireland JJ. 1987. Control of follicular growth and development. *J. Reprod. Fertil. Suppl* **34**:39-54.

Jones EC & Krohn. 1961a. The effect of hypophysectomy on age changes in the ovaries of mice. *J. Endocrinol.* **21**:497-509.

Jones EC & Krohn. 1961b. The relationships between age, numbers of oocytes and fertility in virgin and multiparous mice. *J. Endocrinol.* **21**:469-495.

Jost A. 1947. Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. II Action des androgènes synthèse sur l'histogénèse génitale. *Arch. d'Anat. Microsc. Morphol. Exp.* **36**: 242.

Jost A. 1953. Problems in fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Rec. Prog. Horm. Res.* **8**:379.

Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P & Lovell BR. 1991. Male development of chromosomally female mice trasgenic for Sry. *Nature.* **351**:117-121.

Leung PCK & Armstrong DT. 1980. Interactions of steroids and gonadotropins in the control of steroidogenesis in the ovarian follicle. *Ann. Rev. Physiol.* **42**:71-82.

Lovell BR & Robertson E. 1990. XY female mice resulting from a heritable mutation in the primary testis determining gene Tdy. *Development.* **109**:635-646.

Lintern-Moore S. 1972. Iniciation of follicular growth in the infant mouse ovary by exogenous gonadotropin. *Biol. Reprod.* **17**: 635-639.

Mannan MA & O'Shaughnessy PJ. 1988. Ovarian steroid metabolism during postnatal development in the normal mouse and in the adult hypogonadal (hpg) mouse. *J. Reprod. Fertil.* **82**:727-734.

Mannan MA & O'Shaughnessy PJ. 1991. Steroidogenesis during postnatal development in the mouse ovary. *J. Endocrinol.* **130**:101-106.

Makris A & Ryan KJ. 1975. Progesterone, androstendione, testosterone, estrone and estradiol synthesis in hamster ovarian follicle cells. *Endocrinology.* **96**:694-701.

Merchant-Larios H. 1975. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and whithout germ cells. An ultrastructural study. *Dev. Biol.* **44**:1-21.

Merchant-Larios H. 1976. The role of germ cells in the morphogenesis and cytodifferentiation of the rat ovary. In: *Progress in Differentiation Research.* Muller-Berat (ed). North Holland Pub Co., Amsterdam. 463-472.

Merchant-Larios H & Alvarez-Buylla A. 1986. Primordial germ cells use fibronectin as a substrate for migration. *Exp. Cell Res.* **165**:362-368.

Merchant-Larios H & Chimal MJ. 1989. The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. In: *Developments in ultrastructure of reproduction*. Alan R. Liss INC. 55-63.

Merchant-Larios H & Taketo T. 1991a. Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *J. Elect. Microscop. Tech.* 19:158-171.

Merchant-Larios H, Villalpando Y & Taketo H. 1991b. Morfogenesis gonadal en mamíferos. In: *Reproduction, growth and development*. Serono Symposia publication from Raven Press. Editors Negro V. New York. 71:1-11.

Merchant-Larios H, Clarke HJ & Taketo T. 1994. Developmental ariest of fertilized eggs from the B6.Y^{DOM} sex-reversed female mouse. *Dev. Genet.* 15:435-442.

Mintz B. 1960. Embryological phases of mammalian gametogenesis. *J. Cell Comp. Physiol.* 55:31-45.

Moon YS, Dorrington JH & Armstrong DT. 1975. Stimulating action of follicle stimulating hormone on estradiol-17 β secretion by hypophysectomized rat ovaries in organ culture. *Endocrinology.* 97:244-247.

Münsterberg A & Lovell-Badge R. 1991. Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development.* 113:613-624.

Murphy LJ, Bell GI & Friesen HG. 1987. Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology.* 120:1279.

Nagamine CM, Taketo TH & Koo GC. 1987. Morphological development of the mouse gonad in tda-1 XY sex-reversal. *Differentiation.* 33: 214-222.

Nishioka K & Lamothe E. 1986. Isolation and characterization of a mouse Y chromosomal repetitive sequence. *Genetics.* 113: 417-432.

Nishioka K. 1988. Application of Y chromosomal repetitive sequences to sexing mouse embryos. *Teratology.* 38:181-185.

Ohno S. 1967. Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes. New York: Springer. 1-185.

Pelliniemi LJ. 1975. Ultrastructure of the early ovary and testis in pig embryos. *Am. J. Anat.* 144:89-112.

Pérez Vantine DR. 1997. Ontogenia de la expresión del ácido ribonucléico mensajero (ARNm) para la enzima P450_{17 α} y la hormona inhibitoria de los conductos de Müller (MIS) durante el desarrollo postnatal del ovario en el ratón B6.Y^{POS}. Tesis. Facultad de Química, UNAM. México.

Peters H. 1969. The development of the mouse ovary from birth to puberty. *Acta Endocrinol. Scand.* 62:98-116.

Peters H. 1978. Folliculogenesis in mammals. In: *The Vertebrate Ovary*. Jones RE (ed). New York: Plenum. 121-140.

Pinkerton JHM, McKay DG, Adams C & Hertig AT. 1961. Development of the human ovary a study using histochemical techniques. *Obstet. Gynecol.* 18:152.

Ramasharma K, Cabrera CM & Li CH. 1986. Identification of insulin-like growth factor-II in human seminal and follicular fluids. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 140:536-542.

Rechler MM & Brown AL. 1992. Insulin-like growth factor binding proteins: gene structure and expression. *Growth Regul.* 2:55-68.

Richards JS. 1975. Content of nuclear estradiol receptor complex in rat granulosa cells during follicular development: modification by estradiol and gonadotropins. *Endocrinology.* 97:1174-1184.

Richards JS, Ireland JJ, Rao MC, Bernath GA, Midgley AR Jr & Reichert LE. 1976. Ovarian follicular development in the rat: hormone receptor regulation by estradiol, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone. *Endocrinology.* 99:1562-1570.

Richards JS. 1980. Maturation of ovarian follicles: Actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol. Rev.* 60:51-89.

Richards JS, Jahnsen T, hedin L, Lifka J, Ratoosh S, Durinca J & Goldring N. 1987. Ovarian follicular development from physiology to molecular biology. In: *Rec. Prog.Horm. Res.* 231-276.

Sara VR & Hallk. 1990. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol. Rev.* 70:591-594.

Short RV. 1960. Steroides present in the follicular fluid of the mare. *J Endocrinol.* 20:147-156.

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Matthijs S, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell BR & Goodfellow PN. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homolgy to a conserved DNA binding motif. *Nature.* 346:240-244.

Taketo T, Nishioka Y, Nagamine CM, Villalpando I & Merchant-Larios H. 1989. Development and fertility of ovaries in the B6.Y^{DOM} sex-reversed female mouse. *Development.* 107: 95-105.

Telfer EE. 1996. The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. *Theriogenology.* 45:111-120.

Uilenbroek JTJ & Richards JS. 1979. Ovarian follicular development during the rat estrous cycle: gonadotropin receptors and follicular responsiveness. *Biol. Reprod.* 20:1159-1165.

Vedhuis LD, Strauss JF III, Silavin SL & Kolp LA. 1985. The role of cholesterol esterification in ovarian steroidogenesis: studies in cultured swine granulosa cells using a novel inhibitor of acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Endocrinology*. 116:25-30.

Vedhuis JD, Rodgers RJ, Dee A & Simpson ER. 1986. The insulin-like growth factor, somatomedin C, induces the synthesis of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 and adrenodoxin in ovarian cells. *J Biol. Chem.* 261:2499-2502.

Vedhuis JD & Rodgers RJ. 1987a. Mechanisms subserving the steroidogenic synergism between FSH and the insulin-like growth factor, IGF-I (somatomedin C): alterations in cellular sterol metabolism in swine granulosa cells. *J. Biol. Chem.* 262:7658-7664.

Vedhuis JD, Nestler JE & Strauss JF III. 1987b. The insulin-like growth factor, IGF-I (somatomedin C), modulates low-density lipoprotein metabolism by swine granulosa cells. *Endocrinology*. 121:340-346.

Villalpando I, Nishioka Y & Taketo HT. 1993. Endocrine differentiation of the XY sex-reversed mouse ovary during postnatal development. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 45:265-273.

Watson J & Howson WH. 1977. Inhibition by tamoxifen on the stimulatory action of FSH on oestradiol-17 β synthesis by rat ovaries in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 49:375-379.

Zmigrod A, Lindner HR & Lamprecht SA. 1972. Reductase pathways of progesterone metabolism in the rat ovary. *Acta Endocrinol.* 69:141-152.

X. APÉNDICE

◆ Medio 199 (1X) suplementado

* Medio 199 (1X) con Sales de Earle, L-glutamina 2 mM, Hepes 21 mM (In Vitro)	100 mL
* Piruvato de sodio 11 mg/ml (Gibco B.R.L.)	1.0 mL
* Penicilina G sódica 5000 UI/ml (Sigma Chemical)	1.0 mL
* Sulfato de estreptomicina 5 mg/ml (Sigma Chemical)	1.0 mL
* NaHCO ₃ 7.5% (Merck)	2.9 mL
* Rojo de fenól 0.5% (Sigma Chemical)	200 µL

El medio se suplementa en esterilidad y se conserva a 4°C hasta su uso.

◆ Medio de cultivo

* Medio 199 (1X) Suplementado (arriba mencionado)	10 mL
* Progesterona 1 mg/ml (Sigma Chemical)	10 µL
* Folligon 1000 UI/10ml de medio (Lab's Intervet B.V.)	1000 UI
* IGF-I recombinante 5 ng/µl (Gibco B.R.L.)	20 µL

Los reactivos se miden con material estéril. El medio se esteriliza con filtro millipore 0.22 µm y se hacen alícuotas de 0.5 mL en tubos (Pyrex) de 12x75 mm estériles para el cultivo.

Dilución de gonadotropinas

* FOLLIGON (FSH/LH 99/1%) 1000 UI LIOFILIZADO

El liofilizado se disuelve en 2 mL de medio suplementado estéril y se adicionan 8 mL de este medio para obtener un volumen final de 10 mL.

* GONADOTROPIL - C (LH) 5000 UI LIOFILIZADO.

El liofilizado se disuelve en 2 mL de medio suplementado y de estos se toman 200 µL que se adicionan a 9.8 mL del mismo medio para obtener un volumen final de 10 mL.

◆ **Solución madre de testosterona 1 mg/ml**

Pesar 1 mg de testosterona (Sigma Chemical) en una balanza analítica y disolver en 1 mL de etanol absoluto (JT Baker). Almacenar a 4°C. Dejar 30 min a Temp. amb. antes de usar.

◆ **Medio mínimo esencial (MEM).**

* Medio McCoy 5a (1X) con L-glutamina (In Vitro, S.A.)	100 mL
* Penicilina G sódica 5000 UI/ml (Sigma Chemical)	1.0 mL
* Sulfato de estreptomicina 5 mg/ml (Sigma Chemical)	1.0 mL
* NaHCO ₃ 7.5% (Merck)	2.9 mL
* Rojo de fenol 0.5% (Sigma Chemical)	200 µL

El medio se suplementa en esterilidad y se almacena a 4°C hasta su uso.

◆ **Solución madre de androstendiona 1 mg/ml**

Pesar 1 mg de Androstendiona (Sigma Chemical) en una balanza analítica y disolver en 1 mL de etanol absoluto (JT Baker). Almacenar a 4°C. Dejar 30 min a Temp. amb. antes de usar.

◆ **Solución de incubación**

* β-Nicotinamida Adenin Dinucleotido NAD (Sigma Chemical)	40 mg
* Nitrozul de tetrazolio NBT (Sigma Chemical)	20 mg
* Dehidroepiandrosterona 5α-androsten-3β-ol-17ona (Sigma Chemical)	2 mg

Disolver el NAD en 20 mL de buffer Tris-HCl 0.2 M pH=7.6 solución 1, disolver el NBT en 20 mL de buffer Tris-HCl 0.2 M pH=7.6 solución 2 y disolver la dehidroepiandrosterona en 0.5 mL de N,N'dimetilformamida (JT Baker) solución 3.

Mezclar las soluciones 1 y 2. Separar 20 mL en una caja Koplín, como control y a los 20 mL restantes agregar la solución 3 para la caja experimental.

◆ Formalina neutra

* Formaldehído 37% (JT Baker)	100 mL
* Fosfato de sodio monobásico (JT Baker)	4 g
* Fosfato de sodio dibásico (JT Baker)	6.56 g
* Agua destilada	1000 mL

Disolver el fosfato de sodio mono y dibásico en 500mL de agua destilada, agregar 100 mL de formaldehído, aforar a 1000 mL con agua destilada y ajustar el pH a 7. Almacenar en frasco ambar.

◆ Solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) 0.05 M

* Fosfato de sodio monobásico (JT Baker)	6.9 g
* Fosfato de sodio dibásico (JT Baker)	7.1 g
* Cloruro de sodio (JT Baker)	8.8 g
* Azida de sodio (Sigma Chemical)	1.0 g
* Albúmina sérica bovina (Sigma Chemical)	10 g
* Agua destilada	1000 mL

Disolver el fosfato de sodio monobásico, dibásico y el cloruro de sodio en 800 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.5 y aforar a 1000 mL. Adicionar la azida de sodio y la albúmina sérica bovina al momento de usarse.