

11261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

16

"ONTOGENIA DE LA EXPRESION DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO SIMILAR A INSULINA TIPO I (IGF-I)
EN EL TESTICULO DEL RATON *Mus musculus*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
BIOMEDICAS (INMUNOLOGIA)**

P R E S E N T A :

BIOLOGO HORACIO VILLAFAN MONROY

Facultad de Medicina



273371

CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.

MEXICO, 2000



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.

ÍNDICE

I RESUMEN	1
II ANTECEDENTES	2
Diferenciación morfológica de la gónada	4
Gónada indiferenciada	4
Diferenciación sexual del testículo	5
Cordones sexuales	5
Espermatogonias	7
Intersticio celular	7
Células de Leydig	8
Síntesis de esteroides en el testículo fetal	8
Papel del mesonefros	9
Diferenciación sexual del ovario	9
Regulación postnatal de las funciones gonadales	13
Características del IGF-I	14
Estructura del gene del IGF-I	14
Características bioquímicas del IGF-I	15
Síntesis	16
Transducción de señales a través del receptor para el IGF-I	17
Receptor para el IGF-I	17
Transducción de señales	17
Proteínas de unión	18

Funciones de los IGFs	19
IGF-I en los testículos y los ovarios postnatales	20
IGF-I en los testículos embrionarios	23
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
IV HIPÓTESIS	25
V OBJETIVOS	26
VI MATERIAL Y MÉTODOS	27
Reactivos químicos	27
Animales	28
Muestras biológicas	28
Aislamiento de los órganos	28
Determinación del sexo genético	29
Sexado de los embriones	30
Aislamiento del DNA plasmídico	30
Características del plásmido pmigf 1-2	30
Extracción del DNA plasmídico	30
Extracción del RNA	32
Cuantificación de los ácidos nucleicos	33
Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcriptasa reversa (RT-PCR)	33
Oligonucleótidos	33

RT-PCR	35
Aislamiento y marcaje de las sondas para la transferencia del RNA	
(Northern blot)	36
Transferencia del RNA	36
Aislamiento del RNA	37
Electroforesis	37
Transferencia	37
Hibridación	38
Transferencia del DNA (Southern blot)	38
Electroforesis	38
Transferencia	38
Hibridación	39
Marcado de la sonda	39
Hibridación	39
Detección	40
Análisis de restricción del fragmento amplificado	40
Cuantificación de proteínas	40
Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE)	41
Transferencia electroforética e inmunodetección	41
Inmunohistoquímica	41
VII RESULTADOS	43

VIII DISCUSIÓN	56
IX CONCLUSIONES	61
X BIBLIOGRAFÍA	62

Abreviaturas

bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos tipo básico
CGP	Células germinales primordiales
5'UTR	Región 5' no traducida
d.g.	Días de gestación
D.O.	Densidad óptica
Dax-1	Gen Dax-1
DC	Displasia campomélica
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfatados
dpp	Días <i>post partum</i>
EDS	Sulfonato de etano dimetano
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FSH	Hormona estimulante del folículo
GH	Hormona del crecimiento
GnRH	Factor liberador de gonadotropinas
Grb2	Proteína 2 unida al factor de crecimiento
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HMG	Grupo de alta movilidad electroforética
Hprt	Hipoxantina fosforribosil transferasa

IGFBP	Proteínas acarreadoras de los IGFs
IGF-I y II	Factores de crecimiento similares a insulina I y II
IRS-1	Substrato receptor I para la insulina
KDa	KiloDaltones
LH	Hormona luteinizante
MIS/AMH	Hormona inhibidora de los conductos de Müller
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfónico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
pmigf1-2	Vector con el DNAc del IGF-I
PMSG	Suero de yegua preñada
Ras	Oncogene del sarcoma de ratas
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcriptasa reversa
SF-1	Factor esteroideogénico 1
SH2	Dominio 2 de homología con src
Sox-3	Gene Sox-3
Sox-9	Gene Sox-9
Sry	Gene putativo determinante del desarrollo testicular
TDF/Tdy	Factor determinante del testículo en humanos y otros vertebrados
TE	Amortiguador de Tris y EDTA

TGF- β	Factor transformante del crecimiento tipo β
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
3'UTR	Región 3' no traducida
Wnt-4	Gene Wnt-4

DEDICATORIAS

A mis padres, el Lic. Vicente Villafán Heredia y la Señora Margarita Monroy Montiel por ser los mejores padres de este mundo, por su inmenso cariño, apoyo y comprensión, por haberme enseñado tantas cosas, no sólo de palabra sino también con hechos y por el orgullo de ser su hijo.

A mis hermanas Margarita y Angelina, mis adorados sobrinos Fernando, Esmeralda, Ericka, Ana, Laura y esa pequeña grandísima luz de esperanza Laura Fernanda.

A mis amigos, por compartir tantos sueños.

A la mejor universidad de este planeta, la UNAM, por darme la oportunidad de adquirir conocimiento y cultura y por conocer a tantas personas, algunas de ellas, fuera de serie.

A todos los alumnos de los grupos 2155 y 2348 de la materia de Biología Molecular de la Célula III de la Facultad de Ciencias de la UNAM, semestres 97-1 y 98-1 por todo lo que aprendí con ellos y lo que me enseñaron.

A todos los ratones que utilicé para este trabajo.

A Dios, por la oportunidad de estar en este tiempo y espacio.

AGRADECIMIENTOS

Para mi esta tesis representa un gran esfuerzo y la conclusión de un período y el inicio de otro por lo que quiero agradecer a las personas que contribuyeron directa o indirectamente a la misma.

A la Dra. Irma Villalpando, directora de esta tesis, por el apoyo y la confianza brindadas para realizar este trabajo en su laboratorio.

A la señora Gloria Bustos por el gigantesco apoyo otorgado a lo largo de estos años y por ser un ser humano excepcional.

Al Q.F.B. David R. Pérez Vantine por toda su ayuda en la parte de computación al inicio de este trabajo, por las agradables charlas vespertinas y por su amistad.

A la Bióloga Flórida J Lizárraga Sánchez por su enseñanza de la PCR, sobre todo en los momentos críticos, por su agradable compañía y su amistad.

A Carlos J Rodríguez Ortiz, estudiante de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica, por compartir conmigo su inteligencia, sus conocimientos y su amistad.

A Laura Angélica Jiménez Montes, por esa chispa continua de alegría y por su ayuda en el sexado de algunas muestras.

A Miguel A. Aguilera por su interés en el trabajo y su buen humor.

A Ricardo Rodríguez Calderón y Lorena Martínez, en su tiempo alumnos del programa Jóvenes hacia la Investigación, por la constancia, dedicación, capacidad y cariño hacia su trabajo.

Al resto de mis compañeros y compañeras del laboratorio, Ma. Eugenia, Silvia, Guadalupe, Daniel, Mario, Omar, Pilar, Lilia, Perla, Yesenia, Adriana, la gran Amanda, Dolores, Doris, Yetzi, Luis y Gabriel por los momentos compartidos.

Al jurado revisor de esta tesis porque sus observaciones fueron realmente valiosas.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García por la enseñanza de la hibridación *in situ*.

Al M.C. Gabriel López Velázquez por su apoyo en la parte de la microscopia electrónica e inmunohistoquímica.

A Cielo Corzo (q.e.d), Dulce e Isabel por el apoyo otorgado para asuntos administrativos.

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo, por su asesoría al inicio de este trabajo.

Al Dr. Merchant y su grupo de trabajo: José Guadalupe, Leda, Norma y Alejandro por las facilidades para el uso de su laboratorio.

A Gina, Gerardo, Javier, Salvador, Josefina, Alejandro, Víctor, Porfirio y la señora Toña, por el cuidado de la cepa de los ratones.

A los fotógrafos José Aviles y Jorge Juárez por su profesionalismo y ayuda en la parte de fotografía.

A Felipe Nájera, Juan Luis Vázquez, Marta Varela, Andrea, Ismael, Pepe, y Juan Carlos por su disposición y apoyo para la adquisición y entrega de reactivos y equipo.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por permitirme formar parte de él y por todo lo que he aprendido.

A mi "angel de la guarda" (durante la maestría), Eva, por todo su apoyo para hacer de las cosas "difíciles" algo extremadamente sencillo.

A la QFB. Pilar Santiago y al M.C. Eduardo Ramírez por brindarme sus conocimientos y amistad.

Tuve el honor de trabajar con tres de los mejores científicos que existen en México, Angel T. Tello López, Alejandro R. Cravioto Quintana y Luis Felipe Jiménez García. Les agradezco la oportunidad que me dieron y todo lo que pude aprender en los aspectos académico y humano.

A mi "familia de Cuernavaca", Rosalinda, Angel, Juan, Natalia y Angélica.

Al Biólogo Humberto Valdovinos Torres, por su apoyo y críticas para empezar a trabajar en la purificación del RNA y por su aguante como mi primer alumno.

A todos los profesores que me han dado clases. En especial quiero resaltar que algún día espero impartir clases como las del Dr. Luis Jiménez Zamudio, el Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina y el Dr. Vianey Ortiz Navarrete.

A toda aquella persona de quién he aprendido algo.

Llego con tristeza a este montón de ruinas de lo que antes fuera un Ministerio que comenzaba a encauzar la educación pública por los senderos de la cultura moderna... He revisado, por ejemplo, los programas de esta nuestra Universidad, y he visto que aquí se enseña literatura francesa, con tragedia raciniana inclusive, y me hubiese envanecido de ello, si no fuese porque en el corazón traigo impreso el espectáculo de los niños abandonados en los barrios de todas nuestras ciudades, de todas nuestras aldeas. Niños que el estado debe alimentar y educar, reconociendo al hacerlo el deber más elemental de una verdadera civilización. Por más que debo reconocer y reconozco la sabiduría de muchos de los señores profesores, no puedo dejar de creer que un Estado, cualquiera que él sea, que permite que subsista el contraste del absoluto desamparo con la sabiduría intensa o la riqueza extrema, es un Estado injusto, cruel y rematadamente bárbaro.

Parte del discurso de José Vasconcelos al tomar posesión de la rectoría de la UNAM

Los hombres han llamado al amor Eros, porque tiene alas; los dioses le han llamado Pteros, porque tiene la virtud de darlas.

Platón

En el cielo aprender es ver, en la tierra es acordarse. Dichoso quien atravesó los misterios. El conoce la fuente y el fin de la vida.

Píndaro

Conócete a ti mismo y conocerás al universo y a los dioses.

Inscripción en el
templo de Delfos

I RESUMEN

El factor de crecimiento similar a insulina tipo I (IGF-I) es una proteína importante para el desarrollo postnatal de los aparatos reproductores masculino y femenino del ratón. Se desconoce, sin embargo, si este factor se expresa durante la fase embrionaria. Así, en el presente trabajo se analizó la expresión del RNAm del IGF-I por RT-PCR y "Northern blot" en el tejido gonadal y el mesonefros de ratones de los 10 a 17 días de gestación (d.g.). Además se evaluó la expresión de la proteína del IGF-I por "Western blot" y su localización celular por inmunohistoquímica a los 11 d.g. En los machos y en las hembras el RNAm del IGF-I se detecta en la cresta genital a los 10 y en la gónada indiferenciada a los 11 d.g. Sin embargo su expresión fluctúa a partir de los 12 d.g tanto en los machos como en las hembras en todas las etapas estudiadas. En los mesonefros de ambos sexos el mensajero del IGF-I está presente en todas las edades analizadas. El análisis por "Western blot" demostró la presencia de varias proteínas de 30-100 KDa. A los 11 d.g. el IGF-I se localiza en el citoplasma y núcleo de las células de la gónada indiferenciada. Estos resultados sugieren que el RNAm del IGF-I se expresa en las gónadas y el mesonefros de ratones machos y hembras y que es regulado diferencialmente en ambos sexos durante la diferenciación morfológica gonadal. La presencia del IGF-I en el núcleo de las células de la gónada indiferenciada indica que este factor podría regular la expresión de otros genes implicados en el desarrollo de la gónada.

II ANTECEDENTES

En los mamíferos la diferenciación sexual es un proceso secuencial que se inicia con el establecimiento del sexo cromosómico durante la fertilización, seguido del desarrollo del sexo gonadal y posteriormente de los fenotipos sexuales (1). Así, si un individuo presenta el cromosoma Y desarrollará un fenotipo masculino. Por el contrario si carece de éste tendrá un fenotipo femenino. Se ha propuesto que el cromosoma Y codifica para un mediador de la determinación sexual, al cual se le denominó factor determinante del testículo (TDF en humanos y Tdy en otros vertebrados) (2). El gene que a la fecha parece ser necesario para dirigir la diferenciación gonadal hacia testículo es el denominado Sry (sex-determining region Y-linked gene) (3). Éste, según su DNAc, codifica para una proteína de 204 aminoácidos, dentro de la cual se encuentra una región que está conservada en las diferentes especies de mamíferos analizadas y que se conoce como caja HMG (high mobility group). En el ratón, el Sry se localiza en el brazo corto del cromosoma Y y está flanqueado por secuencias invertidas de aproximadamente 15.5 kilobases (kb) (4). Los transcritos del Sry son poco abundantes y se han detectado, exclusivamente en el testículo, desde los 10.5 hasta los 12.5 d.g. (5).

El patrón de expresión temporal del Sry apoya su participación en la diferenciación gonadal pues antecede a ésta y posteriormente no se detecta. El transcrito para este gene vuelve a expresarse en el testículo en la fase adulta por lo que podría estar involucrado en alguna otra función (5)

El gene Sry fue inyectado en ovocitos fertilizados de hembras genéticamente XX e indujo que algunos de éstos se desarrollaran como machos estériles, lo cual nos indicaría que el gene es necesario aunque insuficiente para inducir un fenotipo masculino. Probablemente la esterilidad de estos animales transgénicos es debida a la presencia de dos cromosomas X junto a un fragmento del Y (6).

Se ha propuesto con base en las observaciones encontradas al realizar cruza de machos *Mus musculus poschiavinus* con hembras *Mus musculus musculus* (C57Bl/6J) que además del Tdy existen genes autosómicos necesarios para que se lleve a cabo la diferenciación testicular (7). Uno de esos genes es el Sox-9 que codifica para una proteína que posiblemente funciona como factor de transcripción. En su secuencia proteica hay una región similar a la caja HMG por lo que forma parte de la familia de genes relacionados con el Sry (8). En humanos la pérdida de una copia funcional de este gene está asociada a un síndrome denominado displasia campomélica (DC). Este síndrome se caracteriza por defectos en el desarrollo del sistema óseo y en el cartílago, además de anomalías en el sistema olfatorio, el sistema nervioso central, el corazón y los riñones. También, aproximadamente el 75% de los individuos con DC, que son genotípicamente XY, se desarrollan como hembras fenotípicas o hermafroditas (8). En el ratón el Sox-9 se expresa en la gónada indiferenciada tanto en machos como en hembras a los 10.5 d.g. Posteriormente a los 11.5 d.g. está presente en las gónadas XY pero no en los ovarios. Este patrón de expresión se mantiene hasta la etapa postnatal (9).

Diferenciación morfológica de la gónada

Gónada indiferenciada

El primordio gonadal se forma en la superficie ventral o medial del mesonefros a lo largo de su eje longitudinal a partir de la condensación del mesénquima y de las células epiteliales en esa región (10). Las células germinales primordiales (CGP) en el ratón se localizan, inicialmente, en el endodermo y el mesénquima vecino del saco vitelino y del alantoides a los ocho días de gestación (11). Posteriormente las CGP migran a través del mesenterio del intestino posterior hacia la cresta genital usando lamelipodios y dividiéndose mitóticamente. Las células mesenquimáticas y las del epitelio celómico empiezan a proliferar cuando llegan las CGP, con lo que se forma una estructura compacta llamada blastema gonadal (10). Las células del blastema gonadal empiezan a organizarse para formar agregados epiteliales con uniones intercelulares específicas y rodeados por una membrana basal. Es dentro de estos cordones sexuales donde se localizan las CGP (12). Fuera de los cordones, en la región del estroma, hay células de tipo mesenquimático y vasos sanguíneos que irrigan a lo que ahora se denomina la gónada indiferenciada, la cual es morfológicamente similar en machos y hembras. En el ratón*, dependiendo de la cepa con la que se trabaje, la formación de la gónada indiferenciada ocurre entre los 11.0 y 11.5 d.g. (cepa CD 1; en la cepa B6 la gónada indiferenciada se establece entre los 11.0 y 12.5 d.g. (13).

*Nota: el desarrollo embrionario de las gónadas de las ratas está retrasado un día con respecto al de los ratones

Diferenciación sexual del testículo

Los primeros cambios que llevan a la diferenciación estructural de la gónada indiferenciada se detectan en individuos genéticamente machos por una invasión y proliferación de tejido mesenquimático y de vasos sanguíneos de la región del mesonefros y por un mayor compactamiento de los cordones sexuales. Estos cambios, que en el ratón se inician a los 12 d.g. y que siguen un gradiente de diferenciación celular desde el área media hacia los polos caudal y craneal de la gónada, conducen a la separación gradual de los cordones sexuales del epitelio superficial del testículo (10).

Las células epiteliales de la superficie de la gónada se aplanan para formar una capa continua sobre una membrana basal compuesta, en la rata, de laminina, colágenas tipo IV y V, heparán sulfato y fibronectina (14, 15). Además algunas células mesenquimáticas en la corteza se diferencian a fibroblastos, los cuales sintetizan colágena tipo III y luego la tipo IV (16).

Cordones sexuales

Cuando los cordones sexuales se localizan en la médula del testículo se denominan cordones seminíferos y posteriormente al adquirir un lumen se designarán como tubos seminíferos (10). Las células que constituyen a los cordones seminíferos son las células de Sertoli y las CGP (proespermatozonias).

Las células de Sertoli se caracterizan porque adquieren una forma irregular y colonizan la periferia de los cordones. Se han descrito diferentes tipos de

uniones intercelulares entre las células de Sertoli, entre ellas están las uniones estrechas, las uniones ocluyentes y los desmosomas (17,18).

El principal producto secretado por las células de Sertoli en etapa fetal es la hormona antimülleriana (AMH) conocida también como hormona inhibitoria de los conductos de Müller (MIS), que induce la regresión del conducto paramesonéfrico o de Müller (19). En ausencia del MIS el conducto de Müller formaría el oviducto, el útero y el tercio superior de la vagina. El MIS es una glucoproteína de 140 kiloadaltones (kDa) que pertenece a la familia del factor transformante del crecimiento tipo β (TGF- β) (20). Su mecanismo de acción y su regulación no se han definido. Sin embargo, se ha demostrado, *in vitro*, que una región de 2 kilobases en el gene del MIS del ratón, conocida como elemento regulador del MIS-1 (MIS-RE-1), interactúa con el factor esteroideogénico I (SF1). La expresión de transcritos para el SF-1 se observa en testículos de ratón coincidiendo con la del MIS y la regresión del conducto de Müller. Estos datos aunados a la baja expresión de transcritos para el SF-1 y la prácticamente nula presencia del MIS en ovarios fetales implicaría una interacción entre el MIS y el SF-1 en el proceso de diferenciación testicular (21).

El SF1 es una proteína que pertenece a la familia de los receptores nucleares huérfanos y que interacciona con elementos promotores en los genes de las hidroxilasas de esteroides para regular su expresión (22). Se ha demostrado además que el SF1 podría estar involucrado en el desarrollo de las gónadas, de las glándulas adrenales y del cerebro (23).

Espermatogonias

Las células germinales se denominan espermatogonias cuando se encuentran embebidas en los cordones sexuales. Las espermatogonias se localizan inicialmente al azar entre las células de Sertoli y posteriormente entran en un periodo de proliferación para moverse hacia la periferia de los cordones (24). Entre las células de Sertoli y las espermatogonias hay desmosomas y contactos adherentes focales (18). Estos tipos de contactos celulares podrían estar involucrados en la estabilización de las interacciones de las células de Sertoli y las espermatogonias.

Intersticio testicular

Fuera de los cordones sexuales, la región intersticial contiene células mesenquimáticas indiferenciadas, fibroblastos, macrófagos, células de Leydig, y vasos sanguíneos.

En la rata, las células mesenquimatosas contienen vimentina y desmina (15). Algunas de estas células se diferencian a fibroblastos, los cuales producen la colágena tipo III (16). Los macrófagos en el testículo fetal de la rata se diferencian a los 19 d.g. (25) y se localizan junto a las células de Leydig.

Las células mioideas se unen entre si por medio de uniones adherentes y se localizan alrededor de los cordones sexuales formando una capa continua. Se ha propuesto que estas células podrían estar relacionadas con la formación de la matriz extracelular y en la diferenciación de las células de Sertoli (26).

Células de Leydig

La diferenciación de las células de Leydig se inicia después de la formación de los cordones seminíferos. Hay al menos dos generaciones de células involucradas en el desarrollo de las células de Leydig en los mamíferos. Las fetales que son responsables de la síntesis de andrógenos para inducir la diferenciación de los genitales masculinos y las de la fase postnatal que se encargan de mantener las características sexuales masculinas (27).

En la rata las células de Leydig aparecen primero como células individuales, pero hacia el término del desarrollo fetal forman grupos de células muy juntas con "parches" de membrana basal a su alrededor (28).

Síntesis de esteroides en el testículo fetal

El sustrato más importante para la formación de las hormonas esteroides en el testículo, al igual que en otros tejidos esteroidogénicos, es el colesterol, el que puede sintetizarse *de novo* a partir de acetato (en forma de acetil-Coenzima A) o integrarse a la célula a través de las lipoproteínas plasmáticas. Las células de Leydig almacenan el colesterol en forma de gotas de lípidos, las cuales son utilizadas al incrementarse la síntesis de andrógenos (27). En el testículo embrionario del ratón (cepa B6) se ha detectado el ácido ribonucleico mensajero (RNAm) para las enzimas 20,22 desmolasa (P450scc), 3- β hidroxisteroide deshidrogenasa, 17- α hidroxilasa (P450c17) y aromatasa P450 (P450arom)

involucradas en la síntesis de esteroides desde antes de que se diferencie estructuralmente este órgano (13 d.g.) (29).

Los principales esteroides secretados por las células de Leydig son los andrógenos, de los cuales la testosterona es el más importante para el aparato reproductor masculino. Después de ser sintetizada por el testículo fetal esta hormona es convertida, por medio de la 5 α -reductasa, en dihidrotestosterona la cual es responsable, entre otras cosas, de la diferenciación de la uretra, la próstata y los genitales externos en los machos (2).

Papel del mesonefros

Las gónadas de machos y hembras se desarrollan en estrecho contacto con la superficie interna del mesonefros, el cual es el órgano precursor de los riñones postnatales. Al diferenciarse el testículo, los conductos mesonéfricos forman los conductos de Wolf y se piensa que también contribuyen a la organización del *rete testis* y del *rete ovari* (30). Se ha propuesto que en los mamíferos, durante la diferenciación gonadal, las células del mesonefros colaboran a la formación de la estructura del testículo y del ovario por medio de la migración celular y/o por la secreción de diversos factores aún no caracterizados (30, 31, 32).

Diferenciación sexual del ovario

Los resultados de investigaciones recientes parecen indicar que la diferenciación embrionaria del ovario en los mamíferos quizá no sea un proceso

pasivo o que carezca de la actividad genética y bioquímica del testículo. A la fecha se han identificado 3 genes que podrían participar en el desarrollo del ovario. Uno es el Sox-3, cuya proteína puede unirse a la secuencia blanco del Sry. Esto sugeriría que el Sox-3 y el Sry compiten por el mismo sitio de unión. El Sox-3 puede inducir el desarrollo del ovario activando a otros genes o suprimiendo la diferenciación testicular al inhibir la expresión del Sox-9 (33). Otro de los genes que posiblemente esté involucrado en el desarrollo del ovario es el denominado Dax-1. En humanos, genotípicamente XY, la presencia de dos copias de una pequeña región del brazo corto del cromosoma X hace que no se desarrollen los testículos, lo que llevó a proponer que esa región contenía un gene que competía con el Sry y que era importante para el desarrollo del ovario (34). Esta región se denominó "DSS" (del inglés dosage sensitive sex reversal) y de ella se clonó al gene DAX-1. La proteína del DAX-1 está relacionada estructuralmente con la familia de los receptores nucleares huérfanos. La deficiencia en la expresión del DAX-1, debida a deleciones o mutaciones puntuales, causa la hipoplasia adrenal congénita que se caracteriza por una insuficiencia de las glándulas adrenales y un hipogonadismo hipogonadotrópico (34). En ratones, el Dax-1 se expresa en la gónada indiferenciada de machos y hembras a los 11.5 d.g. A los 12 d.g. disminuye su expresión en los machos y en las hembras continua expresándose hasta los 12.5 d.g. Dos días después sólo se detecta en la región del ovario que está adyacente al mesonefros (35). El otro gene asociado a la diferenciación ovárica es el denominado Wnt-4 que pertenece a la familia de proteínas Wnt que son importantes para el desarrollo de diversos

organismos como ratones, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* o los seres humanos (36). Están involucradas en funciones tan diversas como la inducción embrionaria, la generación de la polaridad celular o el origen de ciertos tipos de cancer en los humanos (36). El gene Wnt-4 se expresa en las gónadas indiferenciadas de machos y hembras entre los 9 y 11.5 d.g. A los 12 d.g. deja de expresarse en los machos y continúa en las hembras. Se ha propuesto que el Wnt-4 regula el desarrollo del conducto de Müller, modula negativamente la esteroidogénesis y participa en el crecimiento del ovocito (37).

A diferencia del testículo, el ovario inicia su diferenciación morfológica más tardíamente. El evento que señala el inicio de este proceso es la aparición de células somáticas y capilares sanguíneos en el extremo dorsal de la gónada (38). Esta diferenciación se inicia en los remanentes de los túbulos mesonéfricos, los cuales están en continuidad con grupos de células epiteliales de la gónada para formar el *rete ovarii* (39). A partir de esta zona crecen los ovocitos primarios rodeados por células somáticas organizadas en forma de epitelio cúbico y rodeadas por una lámina basal. Los ovocitos entran en un período de intensa actividad mitótica y presentan puentes intercelulares que los unen entre si y que resultan en la formación de estructuras similares a sincicios (39). Estos puentes se forman porque las mitosis no se completan (hay cariocinesis pero no citocinesis) y es a través de ellos que existe un flujo continuo de organelos e información de una célula a otra para que la maduración de los ovocitos continúe de manera sincrónica hasta que entran a la profase de la primera división meiótica entre los 13 y 15 d.g. (40). Se desconocen las señales que controlan el

inicio de este proceso, sin embargo, se ha propuesto que después de que las CGP llegan a la cresta genital hay una reactivación de un cromosoma X. Además también se sabe que las CGP pierden su capacidad de proliferar antes del inicio de la meiosis. Aunque estos eventos pudieran necesitar de estímulos provenientes del ovario, el inicio de la meiosis es aparentemente independiente de señales externas y ocurre en todas las células germinales a menos de que se expongan a una señal inhibitoria (41). A los 17/18 d.g. la meiosis se suspende y los ovocitos permanecen en el diploteno de la profase de la primera división meiótica (38). La interrupción de la meiosis trae consigo cambios morfológicos que se mantienen hasta que ésta se reinicia en etapa adulta (en la pubertad). Estos cambios incluyen la desaparición de los puentes intercelulares, la individualización de los ovocitos y un incremento en su tamaño.

El proceso de foliculogénesis, esto es, la formación de los folículos primordiales, se inicia en la etapa embrionaria y puede dividirse en 3 fases. La primera o de ovocito se caracteriza porque dentro de los cordones sexuales hay grupos de ovocitos que están en contacto directo entre ellos rodeados por células epiteliales y separados de las células del estroma por una delgada lámina basal. En la fase II o epitelial los ovocitos están separados por células epiteliales dentro de los cordones sexuales. Durante la fase III, también denominada estromal, los ovocitos junto con sus células epiteliales adheridas y la membrana basal están separados por tejido intersticial. Las fases I y II se observan a los 15 d.g. y a los 17 d.g. empiezan a hacerse evidentes los ovocitos en fase III. Las fases II y III

inician después de que comienza la meiosis y la mayor parte de los ovocitos en la fase estromal están en la profase I del proceso meiótico (42).

Regulación postnatal de las funciones gonadales

La hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH), ambas sintetizadas en la hipófisis anterior, regulan diversos procesos en la gónada postnatal de los mamíferos.

La FSH (al igual que la LH) es una glucoproteína compuesta por 2 subunidades, la alfa y la beta, que son cadenas polipeptídicas sencillas unidas por enlaces no covalentes y que tienen carbohidratos unidos en uno o más sitios. La subunidad alfa es común para la FSH, LH y TSH de la misma especie, mientras que la beta es específica para cada hormona y es la responsable de la actividad biológica (2).

La FSH estimula el desarrollo folicular en el ovario y en particular el de las células de la granulosa. Junto con la LH preparan al folículo para la ovulación y la luteinización. Específicamente estimula la producción de la progesterona y de la aromatasa que convierte la testosterona a estradiol (2).

En los testículos la FSH actúa sobre las células de Sertoli para estimular su proliferación y sobre el epitelio germinal para promover la división celular en las espermatogonias y mantener la espermatogénesis (2)

En los testículos la LH estimula la síntesis de testosterona en las células de Leydig (2).

El control de la síntesis y la secreción de ambas hormonas está regulado por una retroalimentación entre las hormonas esteroides sexuales, proteínas como la inhibina y la activina y péptidos hipotalámicos (GnrH) en lo que se denomina eje hipotálamo-hipófisis-gónada (2).

El desarrollo de las funciones de la gónada necesita además de las hormonas mencionadas, de interacciones locales (parácrinas, autócrinas) entre las células para regular el crecimiento y la diferenciación gonadal (43). Se han detectado diversos factores de crecimiento en el testículo y el ovario que pudieran intervenir en las funciones de estos órganos. Entre estos moduladores está el factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I) que se ha demostrado que es necesario para el desarrollo normal de los aparatos reproductores masculino y femenino del ratón.

Características del IGF-I

Estructura del gene del IGF-I

El gene que codifica para el IGF-I se ha caracterizado en el humano, la rata, la oveja, el pollo y el salmón (44); y se ha aislado el DNAC del ratón, el cerdo, la vaca, el cobayo y de *Xenopus* (44). En los mamíferos los genes tienen seis exones, cinco intrones y al menos dos promotores. Los exones 1 y 2 codifican para las regiones alternas 5' no traducidas (5'UTR) y para los codones de inicio de la traducción, los que están junto al marco de lectura abierto localizado en los exones 3 y 4 y probablemente codifican también para los péptidos señal divergentes. El exon 3 codifica para el resto del péptido señal y

parte del dominio B del péptido maduro. El exon 4 codifica el resto del dominio B y los dominios C, A y D y la región amino terminal del péptido E. El exon 5 codifica para una parte del péptido E. En todos los genes del IGF-I el exon 6 codifica el extremo carboxilo terminal del péptido E y la región 3' no traducida (3'UTR) (45,46).

El análisis del DNAC del IGF-I de ratón evidenció que existen al menos dos formas precursoras del IGF-I (A y B), las cuales difieren en el tamaño y secuencia del extremo carboxilo terminal. Las secuencias de los péptidos señal, el IGF-I y los primeros 16 aminoácidos del extremo carboxilo terminal o dominio E de ambos precursores son iguales. La diferencia en la secuencia resulta de la presencia, en la forma B de la prohormona, de una inserción de 52 bases la cual induce un fragmento de 17 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal y provoca un desplazamiento en el marco de lectura del RNAm originando posiblemente otro tipo de mensajero/proteína. También se encontraron variaciones en las regiones 5'UTR y en los sitios de poliadenilación (47). Estos datos sugieren que la estructura del gene del IGF-I en ratón podría ser más compleja que en otras especies.

Características bioquímicas del IGF-I

El IGF-I es un péptido parecido en su estructura y en muchas de sus funciones a la insulina (estimulación de la captación de glucosa y glucógeno, síntesis de lípidos en el tejido adiposo, síntesis de proteínas, DNA, RNA y proliferación celular). Se le conoce también con el nombre de somatomedina-c

porque inicialmente fue reconocido como mediador de las acciones de la hormona de crecimiento o somatotropina (GH) (48). En el plasma sanguíneo de un ser humano adulto normal, la concentración de este péptido varía entre 200-700 ng/ml (49).

El IGF-I está constituido por una sola cadena de aminoácidos. Contiene tres puentes disulfuro y pesa 7.5 kDa. Consta de los dominios peptídicos B, C, A y D, de los cuales los dominios A y B son homólogos estructurales de las cadenas A y B de la insulina. El dominio C es análogo del péptido conector C de la proinsulina y el dominio D no está presente en la insulina (50). El IGF-I tiene además un dominio E, predicho de la secuencia de su DNAc (47). Ese dominio es cortado durante el procesamiento de la prohormona del IGF-I y se ha sugerido que permanece en circulación, aunque se desconoce su posible función (51).

En las especies en las que se ha estudiado la secuencia de aminoácidos, ya sea por análisis directo de la proteína o por deducción de su secuencia a partir del DNAc, el IGF-I tiene 70 residuos de aminoácidos (47).

Se ha identificado diversas variantes del IGF-I (en el cerebro de embriones humanos, en el calostro de bovinos y en el útero de porcinos). Una de ellas carece de los primeros tres residuos de aminoácidos en el extremo amino terminal y tiene una potencia biológica mayor que la forma completa (52).

Síntesis

El órgano principal que sintetiza el IGF-I en etapa postnatal es el hígado. Sin embargo, otros órganos como el riñón, el útero, el ovario y el pulmón también

lo producen, aunque en menor cantidad. La síntesis de este factor en el hígado está regulada por la GH y diversos estudios lo señalan como mediador de las acciones de esta hormona (44).

Transducción de señales a través del receptor para el IGF-I

Receptor para el IGF-I

Los efectos celulares del IGF-I son mediados por la unión de este péptido a su receptor. Este está formado por 2 cadenas alfa y dos cadenas beta (53). La especificidad de unión del ligando está conferida por las regiones ricas en cisteína del dominio extracelular de las subunidades alfa, mientras que la actividad de tirosina cinasa reside en los dominios citoplásmicos de las cadenas beta (53).

Transducción de señales

In vivo, la unión del IGF-I causa la fosforilación de su receptor (54,55). Se sabe que la unión del IGF-I a éste hace que se fosforile, en los residuos de tirosina, un substrato proteico de 185 kDa, al cual se le ha denominado substrato receptor I para la insulina (IRS-I) (56). El análisis del DNAc del IRS-I reveló que contiene 21 sitios potenciales de fosforilación en residuos de tirosinas, seis de los cuales se encuentran en la secuencia YMXM, estructura de reconocimiento que sirve de unión a proteínas que tienen dominios de homología 2 con src (SH2) (el dominio deriva su nombre de su parecido con la región 2 en la cinasa de tirosina codificada por el oncogene src del sarcoma de Rous de las aves) (57). El IRS-I después de fosforilado puede unirse al menos a dos proteínas que contienen

dominios SH2 y que funcionan en cascadas de propagación intracitoplásmica de señales: las subunidades reguladoras de p85 de la cinasa del fosfatidilinositol-3 (PI3) (58) y la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (Grb2) (59). En el caso de la activación de la cinasa PI3 se formaría posteriormente el trifosfato de inositol que serviría como señal para el crecimiento celular. Si el IRS-1 se asocia a Grb2, el oncogene Ras quedaría activado.

Proteínas de unión

El IGF-I se encuentra en la circulación sanguínea y en el espacio extracelular frecuentemente unido a miembros de una familia de proteínas denominada proteínas acarreadoras de los IGFs (IGFBPs) (60). Se han clonado y secuenciado seis de estas proteínas, las cuales tienen un parecido estructural entre ellas y unen específicamente al IGF-I. Se ha propuesto que las IGFBPs tienen cuatro funciones generales que son esenciales para coordinar y regular las actividades biológicas de este factor. Estas funciones son: transportar al IGF-I en el plasma y controlar su acarreo desde el espacio vascular; prolongar su vida media y regular su degradación metabólica; proporcionar una forma de localización específica para ciertos tejidos o células y modular directamente la interacción del IGF-I con su receptor. Además se ha reportado que las IGFBPs pueden también tener efectos directos sobre ciertas funciones celulares como inhibir o potenciar las acciones de los IGFs (61).

Funciones de los IGFs

Los efectos que ejerce el IGF-I *in vitro* sobre diversos tipos celulares pueden ser a corto plazo (catabolismo de proteínas y carbohidratos) o a largo plazo (duplicación y diferenciación celular).

El IGF-I es un péptido mitogénico que induce la expresión celular de c-fos, protooncogene asociado con procesos de proliferación y diferenciación celular (62). *In vitro*, la función más estudiada del IGF-I es la estimulación de la síntesis de DNA y la replicación celular. Se ha demostrado, sobre todo en fibroblastos, que el IGF-I es un factor de progresión en el ciclo celular (63). Células quiescentes en la fase G_0 pueden ser inducidas a entrar a la fase G_1 por los llamados factores de competencia, entre los cuales están el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos de tipo básico (bFGF). El tratamiento solamente con uno de estos factores hace que las células se detengan en G_1 . Si se incuban con el IGF-I y uno de los factores de competencia, las células avanzan en las fases del ciclo celular, sintetizan DNA y proliferan (63). Además el IGF-I induce la síntesis de la ciclina D1 en células derivadas de osteoblastos (64). El IGF-I estimula también una respuesta mitogénica en los condrocitos, las espermatogonias, las células de Sertoli, etc. (61). Asimismo, se ha propuesto que el IGF-I inhibe la apoptosis en células hematopoyéticas humanas (65).

Los IGFs también pueden promover la diferenciación de los mioblastos, los osteoclastos, los condrocitos, los adipocitos y los osteoblastos (60) y además regular la secreción hormonal de diversos tipos celulares (61).

Durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso central la expresión del IGF-I en las neuronas y en varias regiones del cerebro coincide temporalmente con períodos de proliferación en las células precursoras de las neuronas. Esto, aunado a que se sabe que el IGF-I estimula la proliferación y/o la sobrevivencia de neuronas y oligodendrocitos en cultivo y que los ratones transgénicos que sobreexpresan el IGF-I tienen un sobrecrecimiento cerebral sin anomalías anatómicas sugiere que el IGF-I puede influir en el desarrollo de casi todas las regiones del cerebro (66).

IGF-I en los testículos y los ovarios postnatales

Inicialmente la proteína del IGF-I y su receptor se detectaron en extractos totales de testículos de ratas adultas (67,68,69). La presencia del IGF-I se ha analizado en el medio de cultivo de células aisladas de Sertoli (70), Leydig y peritubulares (71,72). Por inmunohistoquímica el IGF-I y su receptor se localizaron en células de Sertoli, espermatidas y espermátocitos secundarios en testículos humanos (73). En otro estudio sólo se detectó el RNAm para el factor de crecimiento similar a insulina tipo II (IGF-II) y las IGFPs 2 a 6 (74).

Durante las primeras dos semanas del desarrollo postnatal el IGF-I está presente en células espermatogénicas, de Sertoli y de Leydig en testículos de ratas (75). Entre la tercera y cuarta semana postnatal la señal del IGF-I disminuye en las células de Sertoli y las de Leydig y en los testículos de ratas adultas sólo está presente en los espermátocitos en paquiteno y las espermatidas (75).

La expresión del RNAm para el IGF-I se analizó en testículos de ratas adultas y se encontró que sintetizan transcritos de 7.5, 4.7, 1.7 y de 1.2 a 0.9 Kb (76,77). También se ha observado que en los testículos de ratones de 14 días *post partum* (d.p.p.) los transcritos para el IGF-I se localizan exclusivamente, de forma difusa, en el compartimiento intersticial. Después, a los 35 d.p.p., sólo las espermatidas sintetizan transcritos para el IGF-I. Tanto a los 14 como a los 35 d.p.p. el RNAm del receptor del IGF-I se detectó en células de Leydig, peritubulares y ocasionalmente en espermatogonias (78).

El análisis de diferentes órganos (páncreas, hígado y cerebro entre otros) de ratones transgénicos para el IGF-I mostró que los testículos tienen el nivel más alto de expresión para este factor (79).

La regulación del IGF-I en el testículo es mediada por diferentes hormonas y no está completamente caracterizada. En testículos de ratas hipofisectomizadas, la LH, la FSH y la GH incrementan la producción del RNAm para el IGF-I. Por el contrario el RNAm para el IGF-II no se modifica con el tratamiento de estas hormonas (80). Se ha sugerido que la combinación de la GH, la FSH y la testosterona regulan los niveles del IGF-I en testículos de ratas hipofisectomizadas y tratadas con EDS (sulfonato de etano dimetano, compuesto químico que destruye a las células de Leydig). Si estas hormonas se aplican por separado no tienen el mismo efecto, lo cual podría indicar que la síntesis de estos factores es compleja e involucra a otros reguladores parácrinos, autócrinos o endócrinos (81). Otro de los factores que pudiera participar en la regulación del IGF-I en testículos de ratas es el retinol (82).

Se ha demostrado que el IGF-I estimula la incorporación de timidina tritiada en células de Leydig (83) y de Sertoli (84), lo cual sugiere que podría estar involucrado en la proliferación de éstas e influir en el desarrollo de las células precursoras de los gametos. Al IGF-I también se le ha adjudicado el papel de modulador de la esteroidogénesis en células de Leydig inmaduras porque incrementó la síntesis de testosterona (85, 86).

En un cultivo primario de células de Leydig de cerdo el IGF-I estimula la producción de testosterona e incrementa el RNAm para el receptor a la LH y el nivel de los mensajeros para las enzimas 20, 22 desmolasa y 17- α hidroxilasa debido a que aumenta la velocidad de transcripción de estos genes. Por el contrario los factores EGF (Factor de crecimiento epidérmico), bFGF y TGF β -1 disminuyen la producción de testosterona, el RNAm para el receptor a la LH y el nivel del mensajero para la 17- α hidroxilasa. Debido a estos resultados se propuso que estos factores podrían regular parcialmente la capacidad esteroidogénica del testículo (87).

Una forma de conocer la función que tiene cierta proteína es la de intervenir en la secuencia del gene que la codifica y después analizar el efecto fenotípico de esta ablación. Con la finalidad de definir las funciones de los componentes de la familia de los IGFs se hicieron mutaciones nulas dirigidas en los genes del IGF-I, IGF-II y el receptor del IGF-I y se encontraron deficiencias en el crecimiento (88) y en la viabilidad de estos ratones (89,90). Un hallazgo importante observado en estos animales fue que en los ratones homocigotos (los que sobreviven) la mutación en el gene del IGF-I provoca alteraciones en el

aparato reproductor de machos y hembras (78). Ambos sexos son infértiles y carecen de conducta sexual. Los machos no presentan comportamiento agresivo al colocarlos junto a otros machos. Las hembras no entran en etapa de estro. En los machos los testículos tienen un tamaño menor del 28 % de los normales y la concentración de testosterona en el suero está disminuida en un 92 %. A nivel histológico los testículos tienen apariencia normal pero cuando se analizan las células de Leydig con el microscopio electrónico se observa que tienen un retraso en su desarrollo ya que las numerosas inclusiones lipídicas citoplásmicas que presentan no están rodeadas por pilas concéntricas de membranas del retículo endoplásmico que son típicas de las células involucradas en la síntesis de esteroides (78). Otra característica es la presencia de gran cantidad de partículas de glucógeno dispersas por el citoplasma, lo cual es típico de células indiferenciadas. Estas observaciones llevaron a proponer que a pesar de que los testículos analizados corresponden a animales de más de 35 d.p.p. el estado de diferenciación de las células de Leydig corresponde a una etapa entre los 10 y 14 d.p.p.. El epidídimo, los conductos deferentes, la vesícula seminal y la próstata son vestigiales. A pesar de la disminución en el tamaño del epidídimo los espermatozoides capacitados fertilizan *in vitro* ovocitos de hembras normales (78).

Los ovarios de los ratones con la mutación nula para el IGF-I tienen un 25 % del peso del ovario normal; contienen folículos primarios, secundarios y antrales pero escasos y pequeños folículos de Graaf y además carecen de cuerpos lúteos. La concentración de estradiol en el suero de estas hembras es la

mitad de la de las normales. Su útero está poco desarrollado y no ovulan al inyectarles PMSG y hCG (78).

En el ovario postnatal del ratón el RNAm (detectado por RT-PCR) del IGF-I se expresa desde 1 hasta cuando menos 40 d.p.p. y la proteína se detecta hasta los 14 d.p.p. en el compartimiento de las células de la teca (91). El RNAm se expresa en las células de la granulosa de los folículos en crecimiento mientras que el receptor para el IGF-I se expresa en las células de la granulosa de todos los folículos (78). Estos datos podrían indicar que el mensajero del IGF-I en el ovario postnatal del ratón se sintetiza y traduce en las células de la granulosa y que actúa de forma parácrina en las células de la teca.

El estudio del sistema del IGF-I en el ovario del ratón mostró además que este órgano sintetiza las IGFBPs 2 a 5, que el RNAm de la IGFBP 2 se localiza en las células de la granulosa y que el IGF-I inhibe la síntesis de la IGFBP-4. En cultivo de células este péptido junto con la FSH estimula la esteroidogénesis y algunas de las IGFBPs (IGFBP-2 y 3) tienen actividad antigonadotrópica (92).

IGF-I en los testículos embrionarios

La insulina o el IGF-I promueven que las gónadas indiferenciadas y genotípicamente XY, después de 7 días de cultivo en medio libre de suero, se diferencien a testículos e incrementen su producción de testosterona. Estos factores no tienen el mismo efecto sobre las gónadas ya diferenciadas (12 d.g.) y en cultivo (93).

III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desarrollo embrionario de la gónada de los mamíferos está influido por diferentes factores. Así, si en el embrión está presente la carga genética del cromosoma Y, la gónada se diferenciará como testículo inducida por el Sry y todos los genes regulados por este. Por otra parte, se ha demostrado que la interrupción del gene del IGF-I provoca alteraciones importantes en el desarrollo y la función de los aparatos reproductores masculino y femenino del ratón en etapa postnatal. Sin embargo, no se ha determinado si este factor está o no presente y cual sería su función en las gónadas durante la etapa embrionaria. Debido a la poca información acerca de las funciones del IGF-I durante el desarrollo embrionario de las gónadas y como un primer paso para dilucidar su función se plantea este proyecto de investigación con la hipótesis y los objetivos siguientes.

IV HIPÓTESIS

El IGF-I es sintetizado desde etapas tempranas en las gónadas embrionarias y es posible que además el mesonefros también exprese este factor

III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desarrollo embrionario de la gónada de los mamíferos está influido por diferentes factores. Así, si en el embrión está presente la carga genética del cromosoma Y, la gónada se diferenciará como testículo inducida por el Sry y todos los genes regulados por este. Por otra parte, se ha demostrado que la interrupción del gene del IGF-I provoca alteraciones importantes en el desarrollo y la función de los aparatos reproductores masculino y femenino del ratón en etapa postnatal. Sin embargo, no se ha determinado si este factor está o no presente y cual sería su función en las gónadas durante la etapa embrionaria. Debido a la poca información acerca de las funciones del IGF-I durante el desarrollo embrionario de las gónadas y como un primer paso para dilucidar su función se plantea este proyecto de investigación con la hipótesis y los objetivos siguientes.

IV HIPÓTESIS

El IGF-I es sintetizado desde etapas tempranas en las gónadas embrionarias y es posible que además el mesonefros también exprese este factor

V OBJETIVOS

1.- Analizar la expresión embrionaria del RNAm del IGF-I en la gónada indiferenciada (10 y 11 d.g.) y en los testículos y ovarios de los 12 a los 17 d.g. (gónada diferenciada).

2.- Establecer si el RNAm de este factor se expresa en el mesonefros a los 11, 12, 14 y 17 d.g. en ambos sexos.

3.- Identificar el tipo celular en el que se localiza la proteína del IGF-I en la gónada indiferenciada a los 11 d.g..

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos químicos

Paraformaldehído, Aldrich. USA. Acrilamida, azul de bromofenol, N,N'-metilen-bis-acrilamida, persulfato de amonio, Bio-Rad Lab., USA. Pronasa, Boehringer Mannheim, USA. Cloranfenicol, Compañía medicinal La Campana, México. Triptona, Difco, USA. Tiocianato de guanidina, Sarkosyl, dietilpirocarbonato (DEPC), Fluka, Suiza. Fenol, Nick translation System, Random Primers System, Gibco BRL, USA. Acetato de sodio, ácido bórico, alcohol isoamílico, citrato de sodio, cloruro de calcio, cloruro de sodio, etanol, fosfato de sodio mono y dibásico, formaldehído, formamida, hidróxido de sodio, isopropanol, metanol, sulfato de cobre pentahidratado, J.T.Baker, México. Carbonato de sodio, cloroformo, reactivo de fenol según Folin-Ciocalteus, tartrato de sodio y potasio, Merck, México. Ácido etilendiaminotetracético dihidratado (EDTA), ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS), agarosa, albúmina sérica bovina, sal disódica de ampicilina, bromuro de etidio, DNAasa, dodecilsulfato de sodio, Ficoll, glicerol, glicina, lisozima de huevo de gallina, 2-β-mercaptoetanol, RNAasa, sulfato de dextran, N,N,N',N'-tetrametiletildiamina, trishidroximetilaminometano, Triton X-100, Tween-20, Sigma, USA.

Para preparar todas las soluciones se usó agua desionizada y en el caso de las técnicas que involucraron trabajar con RNA las soluciones se hicieron con agua-DEPC (agua desionizada tratada con DEPC al 0.1 % y esterilizada a una presión de 120 libras/pulgada²).

Animales

Se usaron ratones de 5 a 7 semanas de edad de la cepa CD 1, los cuales se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas con ciclos de 12 horas (h) de luz y 12 horas de oscuridad, con alimento para ratones (Mouse Diet 5051, Lab Diet, PMI Feeds Inc.) y agua *ad libitum*. En la colonia la duración del periodo de gestación de estos ratones es de 18 días.

Muestras biológicas

Para obtener los embriones de las diferentes edades se colocó, en una caja de polipropileno, a un macho con una hembra durante toda una noche y se revisó la presencia o ausencia del tapón de semen en la hembra a la mañana siguiente entre las ocho y diez de la mañana. El día que se visualizó el tapón se definió como el día cero de gestación.

Aislamiento de los órganos

Las hembras preñadas se mataron por dislocación cervical y se extrajeron los embriones por histerectomía. Con un bisturi se hizo un corte sagital al embrión que abarcó de la última costilla a la región inginal. Los órganos se extrajeron por microcirugía bajo un microscopio de disección (Leica, StereoZoom 6 Photo) y se procesaron de acuerdo a las diferentes técnicas. Para corroborar la edad de gestación se comparó el desarrollo de la extremidad anterior o posterior de cada embrión con los estadios de las mismas previamente reportados (94).

Determinación del sexo genético

El sexo cromosómico de los embriones de 10 y 11 d.g. se determinó por la amplificación, a través de la PCR, del gene Sry (95) a partir del DNA extraído (96) de todo el embrión después de haber aislado los complejos urogenitales. 0.5 microgramos de DNA (en un volumen de 5 μ l) se desnaturalizaron cinco minutos (min) a 95 °C y se colocaron en hielo. Posteriormente se le adicionaron 45 μ l de una solución que contenía 1.5 mM de cada uno de los siguientes desoxinucleótidos: dATP, dGTP, dCTP y dTTP (Perkin Elmer, USA), Tris-HCl 50 mM pH 9.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15 mM, MgCl_2 7mM, Nonidet P-40 0.05 %, 0.17 mg/ml de albúmina sérica bovina, 500 ng de cada oligonucleótido (Cuadro 1), 1.0 unidad de la polimerasa de DNA AmpliTaq® (Perkin Elmer, USA) y agua-DEPC. Las muestras se incubaron en un ciclador térmico Perkin Elmer 9600 con un programa de 30 ciclos. Cada ciclo incluyó las siguientes temperaturas y tiempos: desnaturalización a 94 °C 30 segundos (seg), alineamiento a 60 °C por 1.0 min. y síntesis a 72 °C por un min. Como control negativo se omitió la presencia de DNA y se amplificó DNA de ovario de ratón adulto. El control positivo incluyó la amplificación del Sry de testículo de ratón adulto y de la enzima Hprt (hipoxantina fosforibosil transferasa). El tamaño esperado del producto de la PCR del Sry es de 266 pb y el de la Hprt de 352 pb.

Sexado de los embriones de 12 a 17 d.g.

El sexo de los embriones de los 12 a los 17 d.g. se identificó bajo un microscopio de disección de acuerdo a los siguientes criterios morfológicos: los testículos de 12 d.g. se distinguen por la presencia de los cordones testiculares y su abundante irrigación. A los 13 d.g. aumentan de tamaño en comparación con los ovarios y se siguen distinguiendo por los cordones y la irrigación. De los 14 a los 17 d.g. los testículos se hacen redondos y descienden a una posición inguinal.

Los ovarios no presentan cordones testiculares y durante su desarrollo embrionario siempre permanecen junto al polo inferior del mesonefros.

Aislamiento del DNA plasmídico

Características del plásmido pmigf 1-2

El plásmido con el inserto del DNAC que codifica para el IGF-I de ratón fue donado por el Dr. Graeme I. Bell del Instituto Médico Howard Hughes de Chicago, USA. El DNAC está clonado en el vector pBR327, el cual contiene un gene que codifica para la resistencia a ampicilina. El inserto se corta con la enzima Eco RI y la bacteria hospedadora es la cepa HB 101 de *Escherichia coli*. El inserto para el IGF-I tiene un tamaño de 720 pares de bases.

Extracción del DNA plasmídico

El DNA se aisló de acuerdo al siguiente protocolo (96). Se creció la cepa en 100 ml de medio Luria líquido con ampicilina (50 µg/ml) y cloranfenicol (170 µg/ml) a 37 °C y 200 rpm 18 horas. El medio se centrifugó a 8000 rpm 5 min. a 4

°C y el precipitado de células se congeló en un baño de hielo seco y etanol 15 min. Las células se resuspendieron en 4 ml de sacarosa al 25 % p/v en Tris-HCl 50 mM, EDTA 1.0 mM pH 8.0 y se le agregaron 2 ml de EDTA 0.25 M pH 8.0 y 1.0 ml de lisozima (5 mg/ml en Tris-HCl 0.25 M pH 8.0). Se incubó en hielo 15 min. Se adicionaron 0.7 ml de mezcla lítica 3X (0.3 ml de Triton X-100 al 10 % v/v, 7.5 ml de EDTA 0.25 M pH 8.0, 1.5 ml de Tris-HCl 1.0 M pH 8.0, 0.7 ml de agua) y se dejaron en hielo 15 min. Se centrifugó a 10 000 rpm una h a 4 °C. El sobrenadante se decantó a un tubo Corex de 30 ml, se le agregaron 40 µl de RNAasa (5 mg/ml, en un amortiguador de acetato de sodio 0.1 M, EDTA 3.3 X 10⁻⁵ M pH 5.0, hervida 10 min.) y se mantuvo a 37 °C una h. Se adicionaron 100 µl de pronasa (5 mg/ml en Tris-HCl 0.25 M pH 8.0 incubada 90 min. a 37 °C) y se incubó 30 min. a 37 °C. Se agregaron 8.0 ml de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó vigorosamente. Se centrifugaron las muestras a 8000 rpm 10 min. a 4 °C y se repitió la extracción. Se transfirió la fase acuosa a un tubo Corex de 30 ml y se agregaron 8.0 ml de cloroformo y se agitó en un vortex. Se centrifugó a 8000 rpm 10 min. a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un tubo Corex de 15 ml que contenía 15 µl de NaCl 5.0 M, se agregaron 8.0 ml de etanol absoluto y se incubó a -20 °C 18 h. Posteriormente se centrifugó a 8000 rpm 15 min. a 4 °C, se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 70 % v/v. Se centrifugó y la pastilla se resuspendió en 4 ml de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1.0 mM pH 8.0). Se agregaron 100 µl de NaCl 5.0 M y 4.5 volúmenes de etanol y se precipitó en un baño de hielo seco-etanol. Se centrifugó y se lavó la pastilla con etanol al 70 % v/v. El precipitado se

resuspendió en 400 µl de TE y se transfirió a un tubo Eppendorf que contenía 15 µl de NaCl 5.0 M y se adicionaron 830 µl de etanol absoluto. Se dejó precipitar en un baño de hielo seco-etanol, se centrifugó y la pastilla se lavó con etanol al 70 % v/v. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µl de TE.

Extracción del RNA

El RNA total de los órganos se aisló de acuerdo a la técnica de Chomczynski y Sacchi, 1987 (97). Todo el proceso se realizó a 4 °C a menos que se indique otra temperatura. Los pasos de centrifugación se hicieron a 14000 rpm 20 min.

El tejido se homogeneizó en 100 µl de la solución D (tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM pH 7.0, Sarkosyl 0.5 % p/v y 2 β-mercaptoetanol 0.1 M) en un tubo Eppendorf y con pistilo de teflón. Se adicionaron secuencialmente los siguientes reactivos: 10 µl de acetato de sodio 2 M pH 4.0, 100 µl de fenol saturado con agua-DEPC y 20 µl de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). Las muestras se agitaron en un vortex después de adicionar cada uno de los reactivos anteriores y se incubaron en hielo 15 min. Los tubos se centrifugaron y se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio al cual se le adicionó un volumen de isopropanol similar al de la fase acuosa y se mezcló 10 seg. con la mano. Se dejaron precipitando las muestras a -20°C una h. y se centrifugaron. El sobrenadante se decantó y el precipitado se disolvió en 30 µl de la solución D. Se agregó un volumen de isopropanol y se incubó a -20°C

una h. Se centrifugaron las muestras y el precipitado se lavó dos veces con 100 μ l de etanol al 75 % v/v. El precipitado final se dejó secar al vacío por una h, se resuspendió en 9 μ l de agua-DEPC y se almacenó a -70°C.

Cuantificación de los ácidos nucleicos

Se hizo una dilución 1:500 del DNA/RNA aislado y se midió la densidad óptica (D.O.) a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 600. Para calcular la cantidad de DNA en la muestra se tomó en cuenta que una solución de 50 μ g/ml de DNA de doble cadena tiene una D.O.₂₆₀ de 1.0. De la misma forma, a una solución de 40 μ g/ml de RNA le correspondería una D.O.₂₆₀ de 1.0. La relación entre las densidades ópticas a 260 y 280 nm debe dar un cociente de 1.8 a 2.0 para que se tenga una pureza adecuada (96).

Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcriptasa reversa

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se diseñaron en base al DNAC publicado para el IGF-I (77) (Cuadro I y fig 1). Para el Sry y el Hprt se utilizaron los diseños de Jeske et al, 1996 (95) y de Lee y Taketo, 1994 (98) respectivamente (Cuadro I). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Gibco BRL, Life Technologies, USA .

Gene	Oligonucleótido	
	Sentido (5'→3')	Antisentido (5'→3')
IGF-I	ACCAGAGACCTTTGCGGGGCT	AAGTGACTTCCTTCTGAGTCT
Sry	GAGAGCATGGAGGGCCAT	CCACTCCTCTGTGACACT
Hprt	CCTGCTGGATTACATTAAGCACTG	GTCAAGGGCATATCCAACAACAAAC

Cuadro 1. Secuencia de los oligonucleótidos usados

TCTGCTTGCTAAATCTCACTGTCGCTGCTAAATTCAGAGCAGATAGAGC
 CTGCGCAATCGAAATAAAGTCCTCAAAATTGAAATGTGACTTTGCTCTAACATC
 TCCCATCTCTCTGGATTTCTTTTTGCCTCATTCTGCCACCAATTCATTTCCA
 GACTTTGTACTTCAGAAGCGatgGGGAAATCAGCAGTCTTCCAACCTCAATTAT
 TTAAGATCTGCCCTCTGTGACTTCTTGAAGATAAAGATACACATcatgTCGTCTTC
 ACATCTCTTCTACCTGGCACTCTGCTTGCTCACCTTTACCAGCTCGGCCACAG
 ➡Dominio B
 CC[GGACCAGAGACCCCTTTGCGGGGCTGAGCTGGTGGACGCTCTTCAATTCG
 ▼ ➡Dominio C
 TGTGTGGACCAAGCCCCCTTTTACTTCAACAAGCCCACA[GGCTATGGCTCCAG
 ➡Dominio A
 CATTCCCACCCACAGACC[GGCATTGTGGATGAGTGTGCTTCCGGAGCTGT
 ➡Dominio D
 GATCTGAGGACCCTCCACATGTACTGTCCTCCG[CTGAAGCCTACAACTCAG
 ➡Dominio E
 CT[CGTTCCATCCGGGCCAGCGCCACAACCTGACATGCCCA**AAGACTCAGAAG**
GAAGTACACTTGAAGAACACAAGTAGAGGAAGTGCAGGAAACAAGACCTACA
 GAATGTAG
 Fin

Fig 1 Secuencia de nucleótidos del DNAc (77) del IGF-I utilizada para diseñar los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. La secuencia de cada oligonucleótido esta subrayada y en negritas. Con una cabeza de flecha se indican los posibles límites entre un exon y un intron. Los posibles sitios de inicio de la traducción están en minúsculas.

RT-PCR

El análisis de la expresión del RNAm para el IGF-I se realizó por la RT-PCR utilizando el "Gene Amp® RNA PCR KIT" de Perkin Elmer .

El RNA total aislado de un par de complejos urogenitales (10 y 11 d.g.), de un par de gónadas (12 a 17 d.g.) o de un par de mesonefros se disolvió en 9 µl de agua-DEPC y se usaron 3 µl para la síntesis del DNAc del IGF-I, 3 µl para el Hprt y 3 µl para el control negativo. El DNAc se sintetizó en un volumen de 20 µl que contenía MgCl₂ 5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.3, dATP, dGTP, dCTP y dTTP 1 mM, una unidad del inhibidor de RNAasas, hexámeros al azar 2.5 µM y 2.5 unidades de la transcriptasa reversa aislada del virus de la leucemia murina (MuLV). Esta mezcla se incubó en un ciclador térmico Perkin Elmer 9600 a 25 °C 10 min., luego la síntesis del DNAc se realizó a 42 °C una h. y la enzima transcriptasa reversa se inactivó a 99 °C por 5 min.

La amplificación se llevó a cabo en un volumen de 100 µl que contenía 20 µl del DNAc, MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, agua-DEPC, 40 picomolas de cada oligonucleótido y 2.5 unidades de la polimerasa de DNA AmpliTaq®. Las muestras se incubaron en un ciclador térmico Perkin Elmer 9600 con un programa de 30 ciclos. Cada ciclo básico incluía las siguientes temperaturas y tiempos: desnaturalización a 94 °C 15 seg., alineamiento a 55 °C 15 seg. y síntesis a 72 °C 30 seg. En el primer ciclo el tiempo de desnaturalización fue de 2 min. y en el último la síntesis se prolongó 10 min. Como control negativo se omitió la presencia de la transcriptasa reversa. Los controles positivos fueron la amplificación del IGF-I de hígado de ratón adulto y de

la enzima Hprt. El tamaño esperado del fragmento amplificado del IGF-I es de 267 pb. Se tomaron 10 µl de cada producto de RT-PCR (IGF-I y Hprt) se juntaron en un tubo Eppendorf y se separaron en los geles.

Aislamiento y marcaje de las sondas para la transferencia del RNA ("Northern blot")

El inserto de la clona del DNAc del IGF-I se aisló digiriendo el plásmido pmigf 1-2 con la enzima de restricción Eco R1. Posteriormente, el producto digerido se separó en un gel de agarosa al 1.5 % p/v en TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2.5 mM pH 8.0) y se electroeluyó. El inserto (300 ng) se marcó con el sistema de secuencias al azar (Random Primers) en presencia de dATP- $[\alpha\text{-P}^{32}]$ (Amersham, USA) dos h.. Después, la sonda se separó de los nucleótidos no incorporados mediante una columna (0.5 X 6 cm) de Sephadex G-50 equilibrada con TEN (Tris 10 mM, EDTA 0.001 M y NaCl 10 mM, pH 8.0) y por centrifugación a 4000 rpm 4 min. Finalmente se determinó el número de cuentas por minuto de la sonda en un contador de centelleo marca Packard modelo Tri-Carb 1500.

Transferencia del RNA

Aislamiento del RNA

El RNA total se aisló, de acuerdo a lo reportado por Chomczynski y Sacchi, 1987 (97), a partir de 50 mg de testículos de 13 a 17 d.g. Para obtener 50 mg de

tejido de 13 y 14 d.g. se colectaron 49 pares de gónadas para cada edad y para los 15 a 17 d.g. fueron 26 pares.

La integridad del RNA aislado se verificó separando 1 µg de éste en un gel de agarosa al 1 % p/v teñido con bromuro de etidio.

Electroforesis

Las muestras de RNA total (20 µg) se separaron en un gel de agarosa al 1.5 % con formaldehído 2.2 M en un amortiguador de MOPS 0.2 M, acetato de sodio 0.5 M y EDTA 0.01 M pH 7.0 a 100 volts (V). Después el gel se lavó dos veces con agua-DEPC 15 min.

Transferencia

El RNA se transfirió, por medio de un aparato Vacu Gene XL (Pharmacia, USA), a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond-N+, Amersham, USA). El gel se incubó 5 min. con agua; luego se hidrolizó parcialmente con una solución de NaOH 50 mM y NaCl 10 mM y se neutralizó con una solución de Tris-HCl 0.1 M pH 7.4. La transferencia se llevó a cabo con SSC 20X (NaCl 3.0 M, $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$ 0.3 M, pH 7.0) una hora a una presión de 50 milibares. Transcurrido ese tiempo la membrana se lavó con el amortiguador de transferencia y después se dejó secar 30 min. Para constatar la integridad del RNA la membrana se incubó en una solución de azul de metileno al 0.04 % p/v en CH_3COONa 0.5 M pH 5.2 10 min. y luego se lavó con agua desionizada 15 min.

Hibridación

La membrana se horneó a 80°C dos h. con vacío y se prehibridó en una solución de SSPE 5X (20X= NaCl 3.6 M, Na₂HPO₄ 0.2 M, EDTA 0.02 M pH 7.0), solución de Denhardt 5X (100X = Albúmina sérica bovina 2 % p/v, polivinilpirrolidona 2 % p/v, Ficoll™ 2 % p/v), SDS 0.5 % y DNA de esperma de salmón (0.5 mg/ml) dos h. a 65 °C con agitación. Posteriormente se adicionó la sonda marcada (0.8×10^6 cpm/ml) y se incubó 18 h. a 65 °C. El filtro se lavó dos veces con SSPE 2X y SDS 0.1 % p/v a temperatura ambiente 10 min. Luego se incubó en SSPE 1X y SDS 0.1 % p/v a 65°C 15 min. y SSPE 0.1X y SDS 0.1 % p/v a 65 °C 10 min. Se expuso la membrana a una película de rayos X (Kodak X-Omat) 3 días a -70 °C. Posteriormente se reveló la placa.

Transferencia del DNA ("Southern blot")

Electroforesis

Las muestras de la amplificación por la RT-PCR del IGF-I se separaron en un gel de agarosa al 2 % en TBE pH 8.0 a 100 V.

Transferencia

El gel se incubó 5 min. en una solución de HCl 0.2 N. Después se desnaturalizó con una solución de NaOH 0.5 M y NaCl 1.5 M 5 min. y luego se neutralizó con Tris-HCl 1.0 M pH 7.5 y NaCl 1.5 M. El DNA se transfirió, utilizando un aparato Vacu Gene XL (Pharmacia, USA), a una membrana de nylon cargada

positivamente (Hybond-N⁺, Amersham, USA) con un amortiguador SSC 20X una h. a una presión de 50 milibares. Posteriormente la membrana se lavó con el amortiguador de transferencia y se dejó secar.

Hibridación

La hibridación y detección del DNA se llevó a cabo con el "DIG High Prime DNA Labeling and Detection Kit for Chemiluminescent detection" de Boehringer Mannheim, Alemania.

Marcado de la sonda

Se marcó 1 µg del inserto del IGF-I por el método de secuencias al azar (Random Primers) en presencia de DIG-11-dUTP con la mezcla "DIG-High Prime" una h. a 37 °C.

Hibridación

La membrana se horneó a 80 °C 2 h. al vacío y se prehibridó con la solución "DIG Easy Hyb" a 42 °C 30 min. con agitación. Después se adicionó la sonda marcada (500 ng) y se incubó 18 horas a 42 °C. Se hicieron dos lavados de 5 min. con SSC 2X y SDS 0.5 % a temperatura ambiente y otros 2 lavados de 15 min. con SSC 0.1X y SDS 0.5 % a 65 °C con agitación.

Detección

La membrana se lavó 5 min. en ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M pH 7.5 y Tween-20 al 0.3 % (MT), se mantuvo 30 min. en la solución de bloqueo (amortiguador 2) y se incubó por 30 min. con los fragmentos Fab anti-digoxigenina a una dilución de 1:10 000. Posteriormente se lavó 2 veces con MT y se equilibró 5 min. en Tris-HCl 0.1 M y NaCl 0.1 M pH 9.5. Se colocaron aproximadamente 20 gotas del sustrato CSPD sobre la membrana y ésta se cubrió con 2 hojas para acetatos; se incubó 15 min. a 37 °C y se expuso a una película de rayos X (Kodak X-Omat) 15 min. a temperatura ambiente. Después se reveló la placa.

Análisis de restricción del fragmento amplificado

Los productos de la RT-PCR del IGF-I se cortaron con la enzima Bsm I (Gibco BRL, Life Technologies, USA) de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante. 1.0 µg de ADN se incubó a 65 °C en Tris-HCl 50 mM pH 8.0, MgCl₂ 10 mM y NaCl 50 mM 2 h.. La reacción se detuvo adicionando 1.0 mM de EDTA pH 8.0. El producto se separó en un gel de agarosa al 2 % y se visualizó con bromuro de etidio.

Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteínas de los extractos testiculares se cuantificó por el método de Lowry y col (99) modificado por Peterson GL (100) utilizando albúmina sérica bovina como proteína de referencia.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE)

Los testículos de 12 a 17 d.g. se homogeneizaron en Tris-HCl 0.25 M pH 6.8 y se separaron en un gel de poliacrilamida al 15 % de acuerdo a la técnica reportada por Laemli UK (101).

Transferencia electroforética e inmunodetección

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron electroforéticamente a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno) (Bio-Rad, USA) en un amortiguador de Tris 10 mM, glicina 0.75 M y metanol al 20 % p/v (96). Posteriormente la membrana se incubó con albúmina sérica bovina al 3 % p/v por 18 horas a 4 °C y luego con un anticuerpo contra el IGF-I (NIH-UB4) a una dilución 1:3000 por 18 horas a 4°C. La membrana se lavó con TBST (Tris 0.1 M, NaCl al 0.9 % p/v y Tween-20 al 0.1 % p/v pH 7.4) y se incubó con un anticuerpo anti IgG de conejo marcado con peroxidasa durante 18 horas a 4 °C. Después de lavar 3 veces con TBST por 10 minutos en cada ocasión, se reveló con 4-cloro-1-naftol al 0.05 % p/v en metanol al 17 % p/v y peróxido de hidrógeno al 0.025 % p/v en TBS (Tris-HCl 0.01 M, NaCl 0.9 % pH 7.4) (102). Como control negativo se incubó el anticuerpo primario con el IGF-I y se realizó la inmunodetección.

Inmunohistoquímica

Los órganos se aislaron de los embriones y se fijaron en paraformaldehído al 2 % p/v y glutaraldehído al 0.5 % p/v en un amortiguador de fosfatos y NaCl

(PBS) 0.1 M pH 7.2 dos h. a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS tres veces 5 min. y se incluyeron en Lowicryl K4M (Polisciencences, USA). La resina se dejó polimerizar con luz UV a 4°C. Se obtuvieron cortes ultrafinos de 70 nm, los cuales se montaron en rejillas de níquel. Las rejillas se dejaron flotando 1 hr. en TBSME (Tris-hidroximetilaminometano 20 mM, NaCl 150 mM, Azida de sodio 20 mM, Tween-20 1% v/v, albúmina sérica bovina 5 % p/v y suero normal de cabra 5 % v/v) a temperatura ambiente. Se incubó con el anticuerpo primario (anti-IGF-I, NIH-UB4) a una dilución 1:200 por 18 hr. a 4°C en una cámara húmeda. Posteriormente los cortes se lavaron con TBSME 15 min. y se incubaron 1.5 hr. con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo acoplado a oro coloidal con tamaño de partícula de 10 nm, Sigma, USA). Se lavó con TBSME 15 min. y 10 min. con agua bidestilada. Finalmente los cortes se contrastaron con acetato de uranilo 5 min. y se observaron en un microscopio electrónico Zeiss EM 10 con un voltaje de aceleración de 80 KV. Como controles se omitieron en algunos casos el primero y en otros el segundo anticuerpo.

RESULTADOS

Aislamiento de la sonda del IGF-I

En este trabajo se utilizó la sonda pmigf 1-2 para detectar secuencias complementarias a ésta en el RNA total de los tejidos analizados. La sonda y el vector donde está insertada se purificaron y el inserto se cortó con la enzima Eco RI. Posteriormente el inserto se electroeluyó y se purificó para tener una cantidad suficiente (aproximadamente 300 ng) con la que se pudiera trabajar.

Sexado de embriones en la etapa indiferenciada

El sexo cromosómico de los embriones de 10 y 11 d.g. se determinó amplificando, por la PCR, el gene Sry. Al analizar, en un gel de agarosa, los productos de la amplificación, solamente en los embriones genotípicamente machos está presente el DNA correspondiente a este gene (fig. 2). Como control positivo se amplificó el gene en el DNA de testículos de ratón adulto. Los controles negativos incluyeron DNA de ovarios postnatales de ratón y la omisión del DNA. En las hembras no se observa la banda esperada de 266 pb.

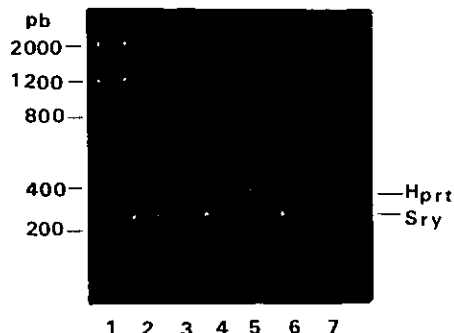


Fig 2. Gel de agarosa al 2%. Productos de la PCR del Sry en tejido embrionario. Los productos de las reacciones individuales para amplificar el Sry y el Hprt se juntaron y se muestran en cada carril. Carril 1, marcador de peso molecular. Carril 2, DNA de embrión macho de 10 d.g., Carril 3, DNA de embrión hembra de 10 d.g., Carril 4, DNA de embrión macho de 11 d.g. Carril 5, DNA de embrión hembra de 11 d.g Carril 6, DNA de testículo de ratón adulto. Carril 7, DNA de ovario de ratón adulto. Las muestras de los carriles 2 a 5 corresponden a los embriones cuyas gónadas se usaron para hacer los experimentos de RT-PCR de la etapa indiferenciada en las figuras 3 y 5.

Ontogenia del RNAm del IGF-I en los testículos

La determinación por la RT-PCR del IGF-I mostró que el RNAm para este gene está presente a los 10 y 11 d.g. En los días 12 y 13 la expresión oscila de manera considerable y de los 14 a los 17 d.g. vuelve a expresarse (fig 3). En todos los carriles se observa la banda correspondiente a la enzima Hprt cuya expresión es constitutiva. En los carriles 10 y 11 se visualizan los controles positivo (RNA de hígado de ratón adulto) y negativo (ausencia de transcriptasa reversa) respectivamente. El experimento completo se repitió tres veces (fig 4). Para confirmar que en las edades de 12 y 13 d.g. el RNAm disminuye su expresión se repitieron cuatro veces más cuatro muestras diferentes para cada edad (fig 4 B1 y 2).

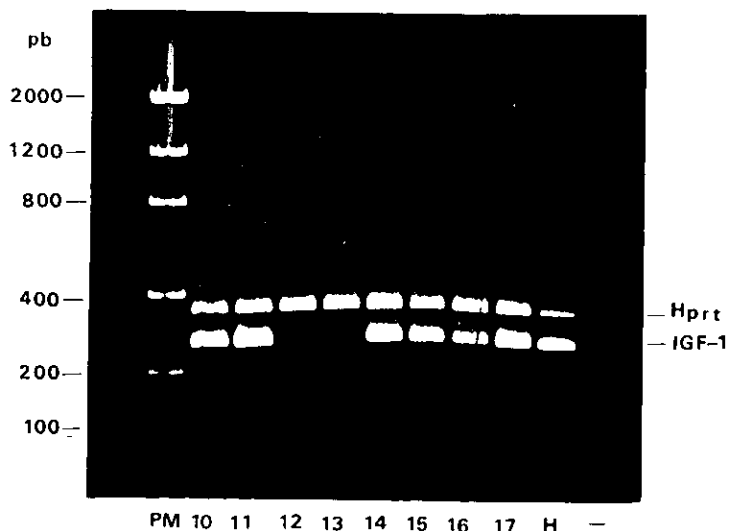


Fig 3. Ontogenia del RNAm del IGF-I en testículos embrionarios de ratón. Carril 1, Marcador de peso molecular (PM). Carriles 2 a 9, productos de la RT-PCR correspondientes a los 10-17 d.g.. Carril 10, RNA de hígado de ratón adulto (H). Carril 11, control negativo de 10 d.g. (sin transcriptasa) (-) (para los demás días también se hicieron los controles sin transcriptasa pero no se muestran).

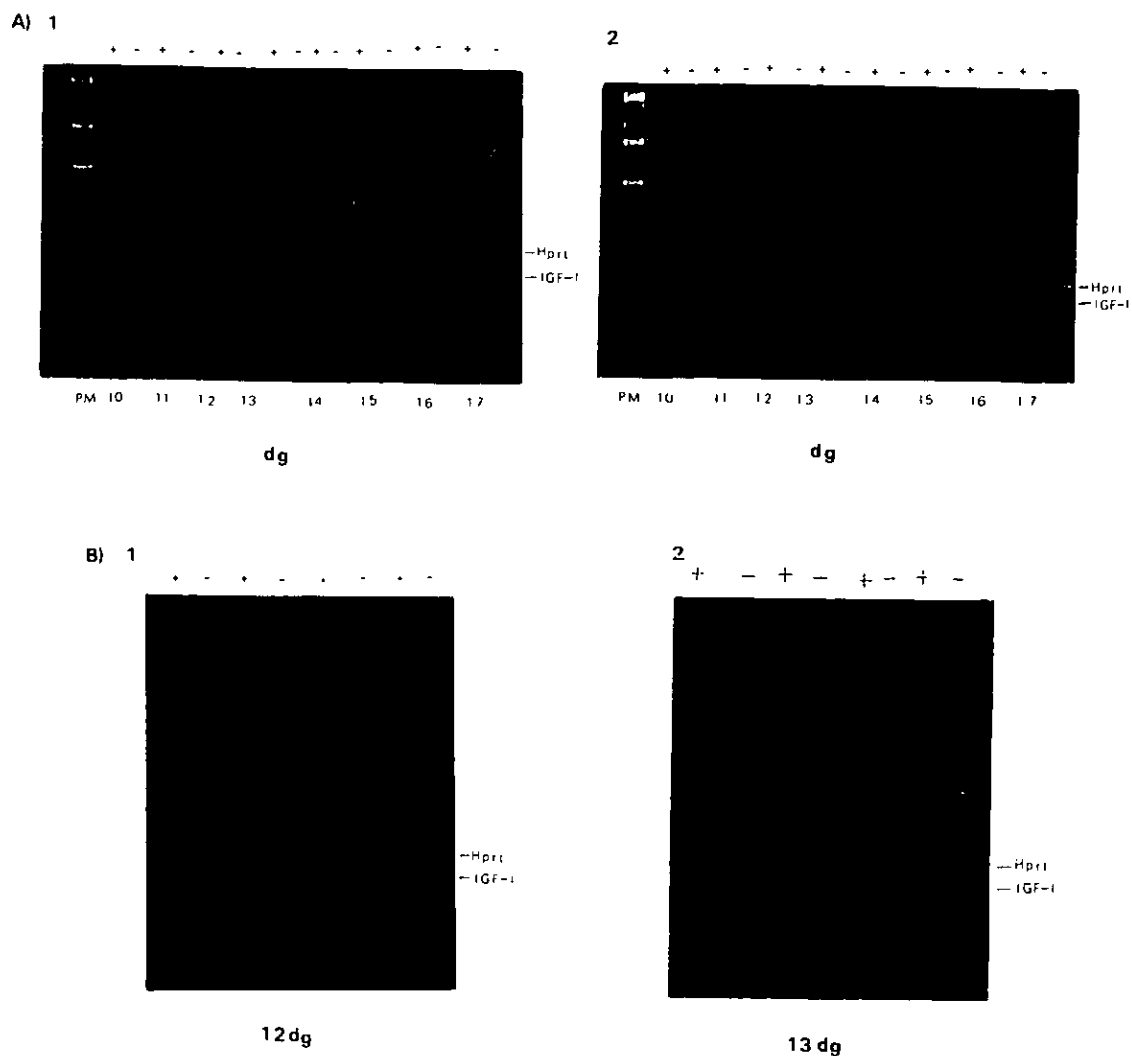


Fig 4. Repeticiones de los experimentos de la ontogenia del RNAm del IGF-I en los testiculos embrionarios. A) 1 y 2 muestran los RT-PCR de los 10 a los 17 d.g con su correspondiente control negativo (sin transcriptasa). B) 1 muestra los resultados de las cuatro repeticiones diferentes con sus controles sin transcriptasa para la edad de 12 d.g. B) 2 cuatro repeticiones diferentes con sus respectivos controles sin transcriptasa de la edad de 13 d.g.

Ontogenia del RNAm del IGF-I en los ovarios

El RNAm del IGF-I está presente a los 10 y 11 d.g.. A los 12 d.g. su expresión fluctúa. Su expresión aumenta a los 13 d.g. y disminuye a los 17 d.g. (fig 5). El carril 10 de esta figura muestra el control negativo. Las figuras 6 y 7 muestran dos repeticiones más de estos experimentos para tener un total de tres repeticiones

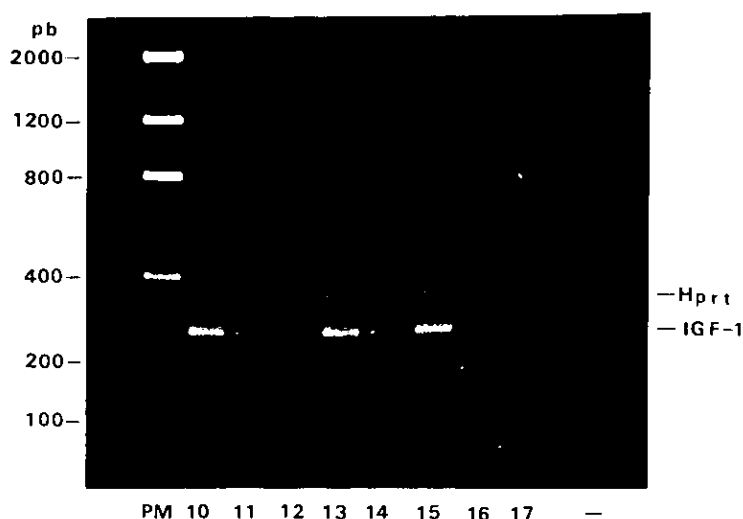


Fig 5. Productos amplificados del RNAm del IGF-I en ovarios embrionarios. Carril 1, Marcador de peso molecular (PM). Carriles 2 a 9 corresponden a los 10-17 d.g. Carril 10, control negativo de 10 d.g. (sin transcriptasa) (-) (para los demás días también se hicieron los controles sin transcriptasa pero no se muestran).

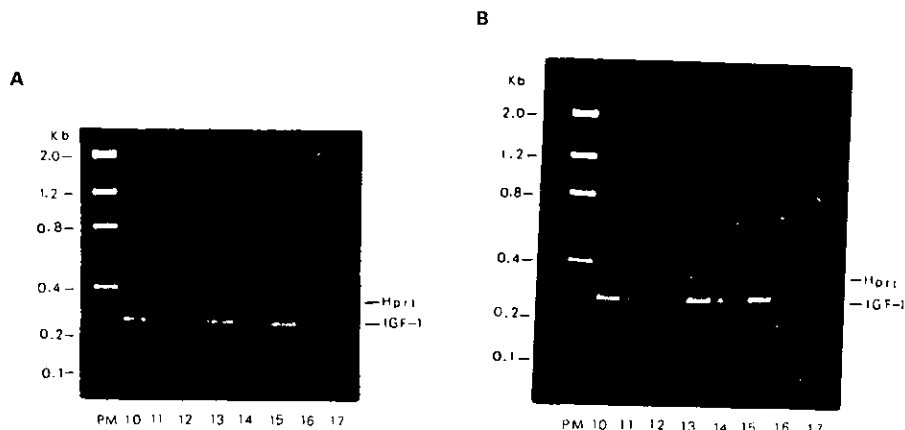


Fig 6. A y B. Repeticiones de los experimentos de la ontogenia del RNAm del IGF-I en los ovarios embrionarios de 10 a 17 d.g. En los controles sin transcriptasa no se observó ninguna banda (datos no mostrados)

Especificidad de los productos de la RT-PCR

La especificidad de los productos de la RT-PCR se determinó: a) mediante el análisis por "Southern blot" de dichos productos (fig 7). La sonda pmigf 1-2 reconoce los productos de la amplificación del IGF-I (carriles 1,3 4 y 5 de la fig 7); b) por la restricción de los productos amplificados con la enzima Bsm I. El fragmento amplificado del DNA del IGF-I tiene un sitio de restricción que reconoce la enzima Bsm I (GAATGTC) que al actuar sobre aquel genera dos fragmentos, uno de 104 pb y otro de 163 pb. En la fig 8 se observa, en el carril 2, el fragmento

amplificado sin cortar que pesa 267 pb y en el carril 3 los productos de digestión con los pesos esperados.



Fig 7. "Southern blot" de los productos amplificados del RNAm del IGF-I e hibridados con la sonda pmigf 1-2. Carril 1, hígado de ratón. Carril 2, agua. Carriles 3 y 4 testículos de 10 y 14 d.g.. Carril 5, ovario de 11 d.g.

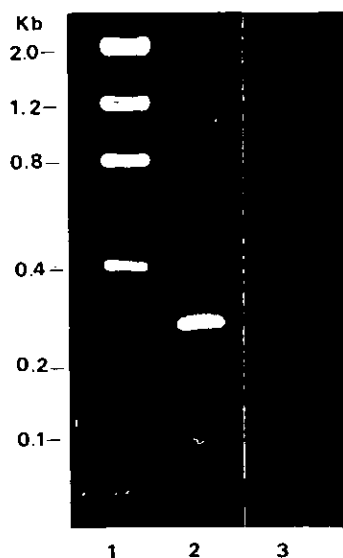


Fig 8. Análisis de restricción de un fragmento amplificado por la RT-PCR del IGF-I con la enzima Bsm I. Carril 1, Marcador de peso molecular. Carril 2, fragmento amplificado sin digerir. Carril 3, productos de la digestión.

Análisis del RNAm del IGF-I por "Northern blot"

Los experimentos de transferencia del RNA y la detección de los mensajeros del gene del IGF-I en los testículos evidenciaron que éste se expresa con transcritos entre 0.7 y 1.5 Kb durante la etapa embrionaria (fig. 9a). La integridad del RNA utilizado en los experimentos se verificó de dos formas: a) analizando el patrón de corrimiento de éste en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (fig.10). En dicha figura se observan las bandas de los RNA ribosomales (18S y 28S) bien definidas; b) tiñiendo la membrana de nylon con azul de metileno después de realizar la transferencia (fig 11) donde también se detectaron las bandas de los RNA ribosomales.

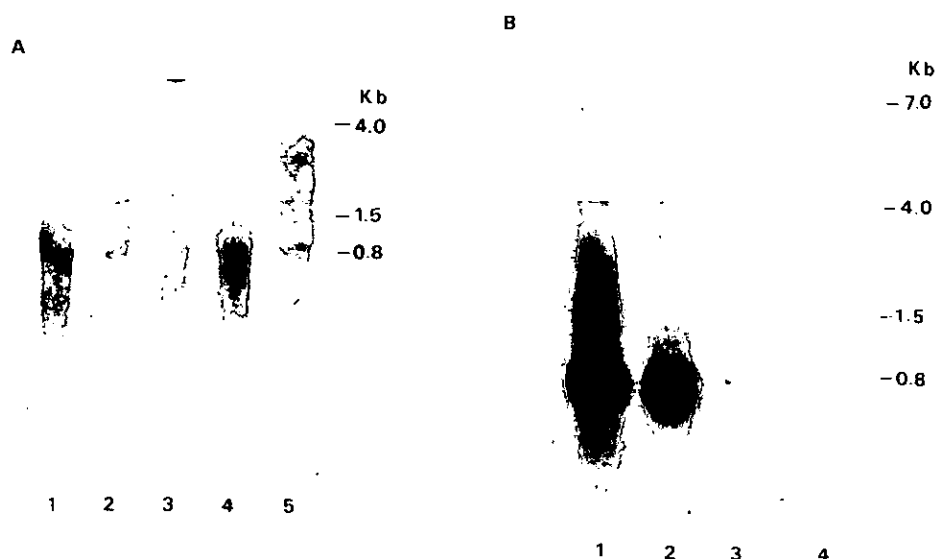


Fig 9. Análisis por "Northern blot" de los transcritos del IGF-I que expresan los testículos embrionarios. A) Carriles 1-5 corresponden de los 13-17 d.g. B) Carriles 1 y 2 RNA de hígado de ratón adulto (20 y 10 μ g respectivamente). Carriles 3 y 4, RNA de testículos de ratón adulto.

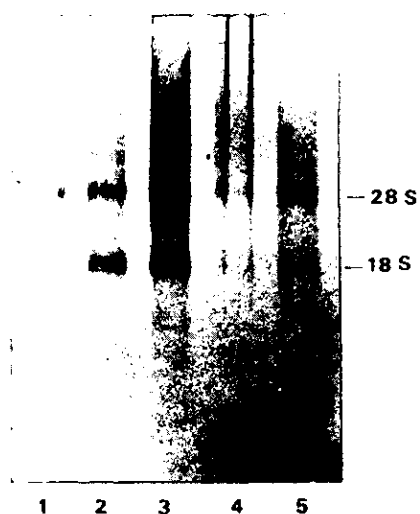


Fig 10. Muestras de RNA total separadas en un gel de agarosa al 1%. Carriles 1-5 corresponden a los 13-17 d.g.. Se observan las bandas de los RNA ribosomales 18 y 28 S.

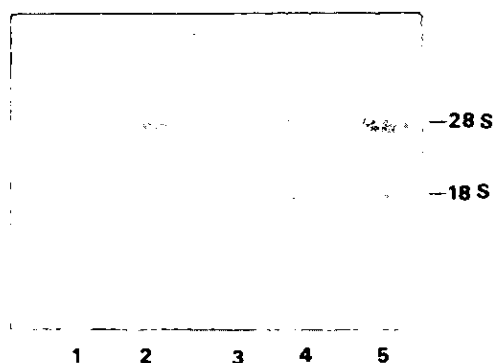


Fig.11. Membrana de nylon teñida con azul de metileno. Se observan las bandas de los RNA ribosomales 18 y 28 S. Los carriles corresponden a las muestras de la fig. 9A .

Expresión del RNAm del IGF-I en el mesonefros

El análisis del RNAm del IGF-I puso de manifiesto que este factor también se expresa en el mesonefros de machos y hembras de los 11 a los 17 d.g. (fig 12).

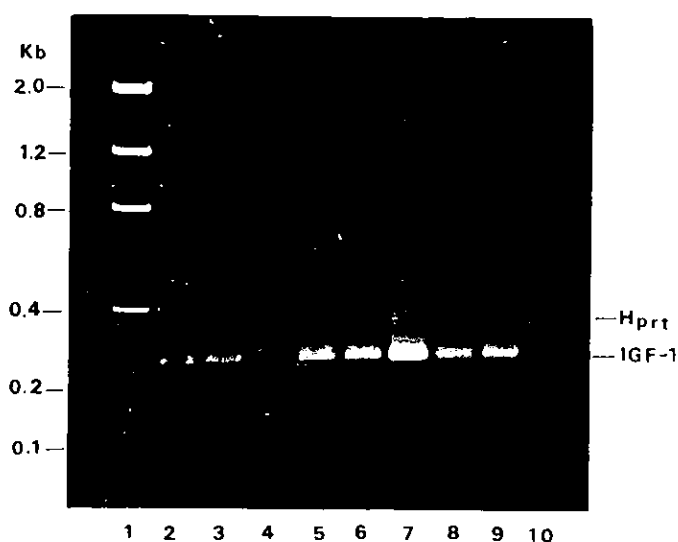


Fig 12. Expresión del RNAm del IGF-I en los mesonefros de machos y hembras. Carril 1, marcador de peso molecular. Carriles 2,4,6 y 8, mesonefros de ratones machos de 11, 12, 14 y 17 d.g. respectivamente. Carriles 3, 5, 6 y 9 mesonefros de embriones hembras de 11, 12, 14 y 17 d.g.. Carril 10 control negativo (sin transcriptasa).

Western blot

El anticuerpo NIH-UB4, utilizado en estudios previos (91), reconoce al menos 5 proteínas con pesos moleculares entre 100 y 30 kDa en los extractos proteicos totales de testículos (fig 13). La especificidad del anticuerpo usado se verificó al incubar éste con el IGF-I y no hubo detección (datos no mostrados).

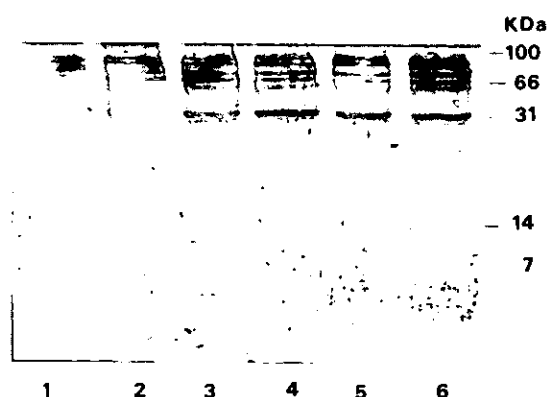


Fig 13. Análisis por "Western blot" de los extractos protéicos totales de testículos embrionarios. Carriles 1-6 corresponden a los 12-17 d.g. respectivamente. Se observan las bandas detectadas por el anticuerpo contra el IGF-I. La banda de 30 K parece incrementar su presencia a partir de los 14 d.g.

Inmunohistoquímica al microscopio electrónico

Se analizaron cortes ultrafinos de complejos urogenitales (machos y hembras genéticos) de 11 d.g. tratados con el anti IGF-I y se observó que este factor se localiza en el citoplasma y en el núcleo de las células que forman este órgano (fig 14). La marca del oro coloidal se detectó en la membrana celular, en el retículo endoplásmico rugoso, en el aparato de Golgi y en el citoplasma. En la fig 15 se muestra un control negativo donde se omitió el primer anticuerpo.



Fig 14. Electromicrografía de una célula de la cresta urogenital de un embrión hembra de 11 d.g.. El IGF-I se localizó en el citoplasma (C) (flechas) y en el núcleo (N), X 35200

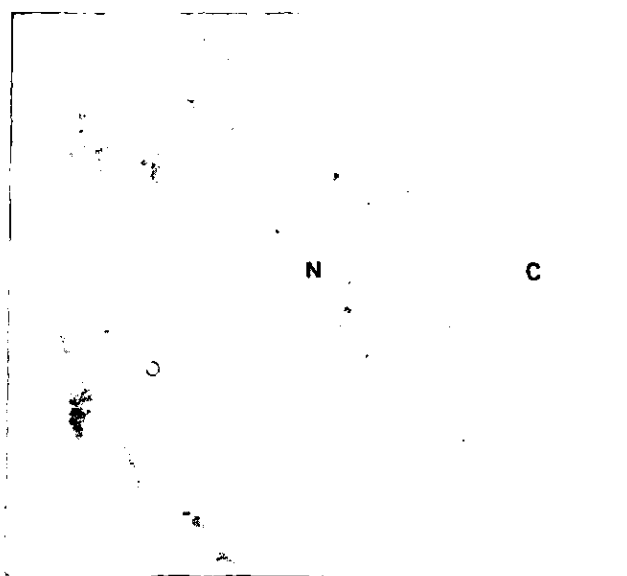


Fig 15. Electromicrografía de una célula de la cresta urogenital de un embrión hembra de 11 d.g. En este experimento se omitió el anticuerpo primario (control negativo). C (citoplasma), N (núcleo) X 12500

DISCUSIÓN

En este trabajo se determinó que el RNAm del IGF-I está presente en las gónadas de ratones machos y hembras a los 10 y hasta los 17 d.g. El patrón de expresión del mensajero de este factor podría indicar que éste se regula de manera diferente en ambos sexos en la etapa de la diferenciación gonadal. Durante el proceso de formación de las gónadas (10 y 11 d.g.) el mensajero del IGF-I está presente en ambos sexos. Se ha propuesto que este factor promueve la proliferación y diferenciación de diversos tipos celulares y que además es un factor de progresión del ciclo celular por lo que puede pensarse que a los 10 y 11 d.g. este péptido esté induciendo a que las células que integran a la gónada indiferenciada proliferen y por consiguiente crezca la gónada. Otra función que pudiera ejercer el IGF-I en esta etapa es la de inducir la motilidad de algunas células como las CGP, las células endoteliales de los vasos sanguíneos o células migratorias del mesonefros ya que se ha observado que este factor induce la polimerización de actina y la subsecuente extensión de prolongaciones (lamelipodios) en diferentes tipos celulares (103).

A los 12 d.g., cuando en la cepa CD1 se puede diferenciar morfológicamente entre ovarios y testículos, la intensidad de la banda del RNAm del IGF-I oscila en comparación con la que había a los 10 y 11 d.g.. En esta etapa de la diferenciación gonadal el Sry ya ha puesto en marcha los cambios morfológicos que hacen que se formen los testículos. Si tomamos en cuenta que el IGF-I induce a que las células proliferen, la disminución en la intensidad de la banda de su mensajero a los 12 y 13 d.g. en los testículos y a los 12 d.g. en los

ovarios podría explicarse porque probablemente para que un órgano empiece a diferenciarse sus células deben dejar de proliferar, con lo que el gene del IGF-I que estaba expresándose a los 10 y 11 d.g., disminuye su síntesis para permitir que se diferencien morfológicamente los testículos y los ovarios. Esta hipótesis está apoyada en experimentos en los que se observó que la capacidad proliferativa y los niveles de la ciclina A2 (asociada a procesos de proliferación celular) de las células precursoras de las células de Leydig disminuyen cuando éstas se diferencian durante la etapa postnatal. Concomitantemente, la ciclina G1 (asociada a procesos de diferenciación y/o apoptosis) aumenta su expresión en las células de Leydig ya diferenciadas (104). Otra explicación alterna y/o complementaria a la observación de la disminución de la banda del mensajero del IGF-I podría ser que la expresión de su RNAm y su probable traducción a proteína estaría impidiendo la expresión de otros genes que tienen que manifestarse en esta etapa del desarrollo gonadal. La disminución de la síntesis del RNAm del IGF-I en ambos tipos de gónadas podría indicar que en esas etapas se expresan otros genes que provocan esa baja en la intensidad de la banda del mensajero. Sería interesante analizar la expresión, en esos tiempos y espacios, de genes como el de p53 y el del retinoblastoma que se sabe regulan el ciclo celular (105).

El hecho de que también en los ovarios de ratón fluctue la banda del mensajero del IGF-I a los 12 d.g. sugiere que al igual que en los testículos, hay un programa de expresión de genes para la diferenciación de estos órganos como es el caso del Sox 3, del Dax1 y del Wnt-4.

En los testículos el RNAm del IGF-I vuelve a expresarse, como lo hacía en la etapa indiferenciada, hasta los 14 d.g.. Es alrededor de esta fecha que se inicia la diferenciación de las células de Leydig y que empieza a sintetizarse la testosterona en el testículo fetal del ratón. La presencia del IGF-I a los 14 d.g. en los testículos de ratón podría asociarse con la regulación de la síntesis de testosterona ya que en etapa postnatal el IGF-I estimula la síntesis de este esteroide y aumenta la velocidad de transcripción de los genes de las enzimas 20,22 desmolasa y 17α hidroxilasa y del receptor a la LH. Además, en los ratones machos con la mutación nula para el IGF-I la diferenciación morfológica de las células de Leydig está retrasada (78). Estos datos sugieren que una de las funciones del IGF-I en el aparato reproductor masculino del ratón podría ser la de regular la síntesis adecuada de testosterona para que se desarrollen de manera normal las células de Leydig.

En los ovarios fetales la reaparición de la síntesis del RNAm del IGF-I ocurre a los 13 d.g. cuando los ovocitos empiezan a entrar en el proceso de meiosis. Las señales que controlan la diferenciación de estas células no se conocen sin embargo, se ha propuesto que en etapa adulta el IGF-I induce el reinicio de la meiosis en cultivos de ovocitos (106) por lo que podría proponerse que el IGF-I estaría asociado al inicio de la meiosis fetal.

En este trabajo se demostró que el RNAm del IGF-I se expresa también en los mesonefros de machos y hembras desde la etapa de gónada indiferenciada y hasta los 17 d.g. lo cual indicaría que este factor participa en el crecimiento, formación y quizá en alguna función de este órgano. Debido a la estrecha relación

anatómica entre la gónada y el mesonefros se ha propuesto que éste, según la especie estudiada, contribuye con células y posiblemente con algún factor difusible a la formación del testículo y del ovario. Se ha sugerido que en el embrión de ratón después de los 11.5 d.g. hay células de la región del mesonefros que pueden migrar hacia los testículos en desarrollo y contribuir a la población de la región intersticial (30) y para el establecimiento de los cordones testiculares (107). También se ha propuesto que el mesonefros puede influir en la formación de la matriz extracelular durante el desarrollo del miembro anterior de los pollos mediante la síntesis de IGF-I (108). Sería interesante analizar si este factor tiene también alguna relación con la expresión de algún componente de la matriz extracelular de la gónada embrionaria porque se ha observado que el IGF-I induce la síntesis de proteoglicanos y del ácido hialurónico en las células peritubulares de testículos inmaduros (109) en etapa postnatal.

Bondy y col. (110) reportaron que en embriones de rata el mesonefros no expresa el mensajero del IGF-I a los 14 d.g. Es probable que existan diferencias específicas de especie o que como ellos localizan el mensajero por hibridación *in situ* en todo el embrión, esta técnica no haya sido tan sensible como la RT-PCR usada en este estudio para detectar la expresión del mensajero del IGF-I.

Los resultados de los experimentos de transferencia de RNA mostraron la detección de transcritos del IGF-I de manera difusa; esto puede deberse a que el RNA estuviera degradado lo cual parece no ser el caso puesto que se observan las bandas de los RNA ribosomales en buen estado. También pudo ser que hubiese colocado un exceso de RNA total, por lo que repetí el experimento con 10

µg de RNA y no hubo detección. Otra posible causa es que el RNAm estuviera en cantidades bajas en los testículos embrionarios por lo que se propone para experimentos futuros purificar el RNAm para tratar de detectar de manera más limpia los transcritos del IGF-I por "Northern blot".

Los experimentos de "Western blot" evidenciaron el reconocimiento de varias proteínas en los extractos de testículos. Existe la posibilidad de que cada proteína hubiera sido sintetizada por un RNAm diferente o que se elaborara una sola proteína y que después se asociara a diversas IGFBP o que se modificara su estructura por fosforilación, metilación, oxidación, acetilación, glucosilación, deamidación o racemización (111). Otra posibilidad es el proceso análogo al corte y empalme del RNA pero en la proteína y que se conoce como "protein splicing" (112). Tampoco debe descartarse la contribución sistémica del IGF-I. La presencia de diferentes bandas en el "Western blot" no se debe a que el anticuerpo sea inespecífico ya que se ha probado en trabajos anteriores (91); además este anticuerpo se incubó con el IGF-I recombinante y posteriormente se realizó el experimento de "Western blot" y no hubo detección. También se ha visto que los macrófagos de ratón sintetizan varias proteínas que son reconocidas por un anticuerpo contra el IGF-I (113).

A los 11 d.g. la proteína del IGF-I se localiza en el citoplasma y el núcleo de las células del complejo urogenital las cuales están proliferando y originando las señales para iniciar el proceso de la diferenciación morfológica gonadal. La presencia del IGF-I en el citoplasma de las células de la gónada y el mesonefros

podría indicar que la células lo están sintetizando y que está en vía para ser exportado o que está siendo internalizado para su degradación.

La localización nuclear del IGF-I sugiere que este péptido podría modular directamente la expresión de otros genes implicados en la diferenciación de la gónada. Se ha observado que diversos factores de crecimiento y hormonas (la insulina, la angiotensina, la LH/FSH, el EGF, el PDGF, la prolactina, etc) se asocian con el núcleo de sus células blanco. Esto sugiere que existe una vía alterna de transporte que lleva a la hormona internalizada hacia el núcleo y no hacia los lisosomas (114).

La localización intracelular del IGF-I se ha detectado en cultivo de células del cristalino de embriones de pollo y en células de riñón. Se determinó que este factor se encuentra en el citoplasma cuando las células están en estado de reposo y que se asocia al núcleo de células en fase proliferativa (115,116).

Experimentos preliminares de inmunohistoquímica en cortes por congelación muestran que el IGF-I se detecta en todas las células de las gónadas indiferenciadas tanto de machos como de hembras (datos no mostrados).

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que :

- 1.- el RNAm del IGF-I se expresa en las gónadas y los mesonefros embrionarios de ratones machos y hembras cepa CD1 desde la etapa indiferenciada,
- 2.- en los machos y en las hembras este gene disminuye su expresión a los 12 d.g. En las hembras la expresión se reinicia a los 13 d.g. y disminuye de nuevo a

podría indicar que la células lo están sintetizando y que está en vía para ser exportado o que está siendo internalizado para su degradación.

La localización nuclear del IGF-I sugiere que este péptido podría modular directamente la expresión de otros genes implicados en la diferenciación de la gónada. Se ha observado que diversos factores de crecimiento y hormonas (la insulina, la angiotensina, la LH/FSH, el EGF, el PDGF, la prolactina, etc) se asocian con el núcleo de sus células blanco. Esto sugiere que existe una vía alterna de transporte que lleva a la hormona internalizada hacia el núcleo y no hacia los lisosomas (114).

La localización intracelular del IGF-I se ha detectado en cultivo de células del cristalino de embriones de pollo y en células de riñón. Se determinó que este factor se encuentra en el citoplasma cuando las células están en estado de reposo y que se asocia al núcleo de células en fase proliferativa (115,116).

Experimentos preliminares de inmunohistoquímica en cortes por congelación muestran que el IGF-I se detecta en todas las células de las gónadas indiferenciadas tanto de machos como de hembras (datos no mostrados).

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que :

- 1.- el RNAm del IGF-I se expresa en las gónadas y los mesonefros embrionarios de ratones machos y hembras cepa CD1 desde la etapa indiferenciada,
- 2.- en los machos y en las hembras este gene disminuye su expresión a los 12 d.g. En las hembras la expresión se reinicia a los 13 d.g. y disminuye de nuevo a

los 17 d.g. ;en los machos se reactiva a los 14 d.g. y se mantiene en las etapas estudiadas,

3.- extractos proteicos de testiculos embrionarios contienen varias proteínas reconocidas por un anticuerpo contra el IGF-I y

5.- la proteína del IGF-I se localiza en el citoplasma y núcleo de las células del mesonefros y de la gónada indiferenciada (11 d.g.).

BIBLIOGRAFÍA

- 01.- Gilbert SF. 1994. Sex determination, Cap. 21. En *Developmental Biology*. Cap 21. Sinauer Associates, Inc. Pag. 759-787.
- 02.- George FW, Wilson JD. 1988. Sex determination and differentiation. Cap 1. En *the Physiology of reproduction*, Knobil E, Neill J et al (de). Pag 3-21. Raven Press Ltd, New York.
- 03.- Gubbay J, Collington J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A, Vivian, Goodfellow PN, Lovell-Badge R. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346: 245-250.
- 04.- Gubbay J, Vivian N, Economou A, Jackson DI, Goodfellow PN, Lovell-Badge R. 1992. Inverted repeat structure of the Sry locus in mice. *Proc.Natl.Acad.sci.USA* 89: 7953-7957.
- 05.- Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. 1990. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation *Nature* 248: 450-452.
- 06.- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow PN, Lovell-Badge R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351: 117-121.
- 07.- Eicher EM, Washburn LL. 1986. Genetic control of primary sex determination in mice. *Ann Rev Gen* 20: 327-360.

- 08.- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioll S, Kwok C, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mausour S, Young ID, Goodfellow PN, Brook JD, Schafer AJ. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372: 525-530.
- 09.- Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genet* 14: 62-67.
- 10.- Merchant Larios H. 1991. Gametogénesis. En *Tópicos selectos de biología de la reproducción*, Cap. 1, Domínguez Casalá (coordinador), Programa Universitario de Investigación en Salud de la Coordinación de Investigación Científica, UNAM y Miguel Ángel Porrúa grupo editorial, México, Pag. 11-39.
- 11.- Ozdzenski W. 1972. Observations on the origin of primordial germ cells in the mouse. *Zoologica Pol.* 17: 367-379. Citado en Merchant Larios H. 1991. Gametogénesis. En *Tópicos selectos de biología de la reproducción*, Cap. 1, Domínguez Casalá (coordinador), Programa Universitario de Investigación en Salud de la Coordinación de Investigación Científica, UNAM y Miguel Ángel Porrúa grupo editorial, México, Pag. 11-39.
- 12.- Pelliniemi LJ, Lautela L.. 1981. Development of sexual dimorphism in the embrionic gonad. *Hum Genet* 58: 64-67.
- 13.- Ginsburg M, Snow M, McLaren A. 1990. Primordial germ cells in the mouse during gastrulation. *Development* 102: 251-258.

- 14.- Paranko J, Pelliniemi LJ, Vaheiri A, FoidartJ-M. Laukkala-Paranko T. 1983. Morphogenesis and fibronectin in sexual differentiation of rat embrionic gonads. *Differentiation* (Suppl) 23: S72-S81.
- 15.- Fröjdman K, Paranko J, Virtanen I, Pelliniemi LJ. 1992. Intermediate filaments and epithelial differentiation of rat male gonad. *Differentiation* 50: 113-123.
- 16.- Paranko J. 1987. Expression of type I and III collagen during morphogenesis of fetal rat testis and ovary. *Anat Rec* 219: 91-101.
- 17.- Gilula NB, Fawcett DW, Aoki A. 1976. The Sertoli cell occluding junctions in mature and developing mammalian testis. *Dev Biol* 50: 142-168.
- 18.- Nagano T, Suzuki F. 1978. Cell to cell relationships in the seminiferous epithelium in the mouse embryo. *Cell Tissue Res* 189: 389-401.
- 19.- Josso N, Boussin L, Knebelmann B, Nihoul-Fékété C, Picard J-Y. 1991. Anti-Müllerian hormone and intersex states. *Trends Endocrinol Metab* 2: 227-233.
- 20.- Pepinsky RB, Siclaira LK, Chow EP, Mattaliano RJ, Manganaro TF, Donahoe PK, Cate RL. 1988. Proteolytic processing of Müllerian inhibiting substance produces a transforming growth factor-beta-like fragment. *J Biol Chem* 263: 18961-18964.
- 21.- Shen W-H, Moore CCD, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA. 1994. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the Müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* 77: 651-661.
- 22.- Ikeda Y, Lala DS, Luo X, Kim E, Moisan M-P, Parker KL. 1993. Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, wich encodes a key regulator of steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol* 7: 852-860.

- 23.- Luo X, Ikeda Y, Parker KL. 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481-490.
- 24.- Gondos B, Bhiraleus P, Hobel CJ. 1971. Ultrastructural observations on germ cells in human fetal ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 110: 644-652.
- 25.- Hutson JC. 1990. Changes in the concentration and size of testicular macrophages during development. *Biol Reprod* 43: 885-890.
- 26.- Tung PS, Fritz IB. 1986. Extracellular matrix components and testicular cells influence the rate and pattern of Sertoli cell migration *in vitro*. *Dev Biol* 113: 119-134.
- 27.- Saez JM. 1994. Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endocr Rev* 15: 574-625.
- 28.- Huhtaniemi I, Pelliniemi LJ. 1992. Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span and special functional features. *Proc Soc Exp Biol Med* 201: 125-140.
- 29.- Greco TL, Payne AH. 1994. Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17 α -hydroxylase/C₁₇₋₂₀ liase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads. *Endocrinology* 135: 262-268.
- 30.- Buehr M, Gu S, McLaren A. 1993. Mesonephric contribution to the testis differentiation in the fetal mouse. *Development* 117: 273-281.
- 31.- Zamboni L, Upadhyay S. 1982. The contribution of the mesonephros to the development of the sheep fetal testis. *Am J Anat* 165: 339-356.

- 32.- Wartenberg H, Kinsky I, Viebahn C, Schmoelke C. 1991. Fine structural characteristics of testicular cord formation in the developing rabbit gonad. *J Electron Microscop Techn* 19: 133-157.
- 33.- Collington J, Sockanathan S, Hacker A et al. 1996. A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development* 122:509-520.
- 34.- Bardoni B, 1994. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nature Genet* 7: 497-501.
- 35.- Swain A, Zanaria E, Hacker A, Lovell-Badge R, Camerino G. 1996. Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. *Nature Genet* 12: 404-409.
- 36.- Cadigan KM, Nusse R. 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11: 3286-3305.
- 37.- Vainio S, Heikkiä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397: 405-409.
- 38.- Zamboni L. 1989. Overview of embryological and fetal development of the ovary and testis. En *Growth factors and the ovary*. Hirshfield AN (ed). Pag. 15-22. Plenum Press. New York.
- 39.- Merchant-Larios H. 1978. Ovarian differentiation. En *The vertebrate ovary*. Cap.2. Pag. 47-81, Jones RE (ed). Plenum Publishing Corp.
- 40.- Odor LD, Blandau JR. 1968. Ultrastructural studies on fetal and early mouse ovaries I. Histogenesis and organogenesis. *J Cell Biol* 36: 276-282.

- 41.- Hunt PA, LeMaire-Adkins R. 1998. Genetic control of mammalian female meiosis. En Handel MA de. 1998. Meiosis and Gametogenesis. Current Topics in Developmental Biology 37: 359-381.
- 42.- Merchant-Larios H, Chimal-Monroy. 1989. The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. En Developments in Ultrastructure of Reproduction (Ed P. Motta). Allan R Liss Inc. New York pp 55-63.
- 43.- Mullaney BP, Skinner MK. 1991. Growth factors as mediators of testicular cell-cell interactions. Baillieres Clin Endocrinol Metab 5: 771-790.
- 44.- Adamo ML, Neuenschwauder S, Le Roith D, roberts CTJr. 1994. Structure, expression, and regulation of the IGF-I gene. en Current directions in insulin-like growth factor research, Le Roith D. y Raizada MK (eds), Plenum Press, New York.
- 45.- Rotwein PS, Pollock K, Didier D, Krivi G. 1986. Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. J Biol Chem 261: 4828-4832.
- 46.- Shimatsu A, Rotwein PS. 1987. Mosaic evolution of the insulin-like growth factors. J Biol Chem 262: 7894-7900.
- 47.- Bell GI, STempien MM, Fong NM, Rall LB. 1986. Sequences of liver cDNA's encoding two different mouse insulin-like growth factor I precursors. Nucleic Acid Res 14: 7873-7882.
- 48.- Salmon WD Jr., Daughaday WH. 1957. A hormonally controled serum factor wich stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. J Lab Clin Med 49: 825-836.

- 49.- Daughaday WH, Rotwein P. 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10: 68-91.
- 50.- Humbel RE. 1984. Insulin-like growth factors, somatomedins, and multiplication stimulating activity: chemistry. En *Hormonal proteins and peptides*, Li CH (ed). Academic Press. pag. 57-79.
- 51.- Powell DR, Lee PDK, Chang D, Lin F, Hintz R. 1987. Antiserum developed for the E peptide region of the insulin-like growth factor IA prohormone recognizes a serum protein by both immunoblot and radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 55: 868-875.
- 52.- Humbel RE. 1990. Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem* 190: 445-462.
- 53.- Werner H, Woloschak M, Staumard B, Shen-Orr Z, Roberts CTJr, Le Roith D. 1991. The insulin-like growth factor I receptor: molecular biology, heterogeneity, and regulation. En *Insulin-like growth factors: molecular and celular aspects*. Le Roith 8th ed). CRC Press, Boca Raton, Pag. 17-47.
- 54.- Steele Perkins G, turner J, Edman JC, Hari J, Pierce SB, Stover C, Rulter WJ, Roth RA. 1988. Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem* 263: 11486-11492.
- 55.- Kato H, faria TN, Stannard B, Roberts CTJ, Le Roith D. 1993. Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I-mimetic antibody (alpha IR-3). *J Biol Chem* 268: 2655-2661.

- 56.- Izumi T, White MF, Takashi K, Takaku F, Akanuma Y, Kusuga M. 1987. Insulin like growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr 185000 protein in intact cells. *J Biol Chem* 262: 1282-1287.
- 57.- Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF. 1991. The structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352: 73-77.
- 58.- Myers MG Jr., Backer JM, Sun XJ, Schoelson S, Hu P, Schlessinger J, Yoakim M, Schffhausen B, White MF. 1992. IRS-I activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10350-10354.
- 59.- Skolnik EY, Batzer A, Li N, Lee C-H, Lowenstein E, Mohammadi M, Schlessinger J. 1993. The function of GRB2 in linking the insulin receptor to ras signaling pathways. *Science* 260: 1953-1955.
- 60.- Sara VR, Hall K. 1990. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev* 70: 591-614.
- 61.- Jones JL, Clemmons DR. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16: 3-34.
- 62.- Ong J, Yamashita S, Melmed S. 1987. Insulin-like growth factor I induces c-fos messenger ribonucleic acid in L6 rat skeletal muscle cells. *Endocrinology* 120: 353-357.
- 63.- Lu K, Campisi J. 1992. Ras proteins are essential and selective for the action of insulin-like growth factor I late in the G1 phase of the cell cycle in BALB/c murine fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3889-3893.

- 64.- Furlaneto RW, Harwell SE, Frick KK. 1994. Insulin-like growth factor-I induces cyclin-D1 expression in MG63 human osteosarcoma cells in vitro. *Mol Endocrinol* 8: 510-517.
- 65.- Muta K, Krantz SB. 1993. Apoptosis of human erythroid colony forming cells is decreased by stem cell factor and insulin-like growth factor I as well as erythropoietin. *J Cell Physiol* 156: 264-276.
- 66.- D'Ercole AJ, Ye P, Calikoglu AS, Gutiérrez-Ospina G. 1996. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol Neurobiol* 13: 227-255.
- 67.- Kawai K, Takano K, Hizuka N, Shizume K. 1979. Properties and concentrations of somatomedin A in various rat tissues. *Endocrinol Jpn* 26: 559-565.
- 68.- 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.
- 69.- Handelsman DJ, Spaliviero JA, Scott CD, Baxter RC. 1985. Identification of insulin-like growth factor-I and its receptors in the rat testis. *Acta Endocrinol* 109:543-549.
- 70.- DePhilip RM, Feldman M, Spruill WA, French FS, Kierszenbaum AL. 1982. The secretion of androgen-binding protein and other proteins by rat Sertoli cells in culture: a structural and electrophoretic study. *Ann N Y Acad Sci* 383:360-371.
- 71.- Tres LL, Smith EP, Van Wyk JJ, Kierszenbaum AL. 1986. Immunoreactive

sites and accumulation of somatomedin-C in the rat Sertoli-spermatogenic cell co-cultures. *Exp Cell Res* 162:33-50.

72.- Cailleau J, Vermeire S, Verhoeven G. 1990. Independent control of the production of insulin-like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells. *Mol Cell Endocrinol* 69: 79-89.

73.- Vannelli BG, Barni T, Orlando C, Natali A, Serio M, Balboni GC. 1988. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: an immunohistochemical study. *Fertility and Sterility* 49: 666-669.

74.- Zhou J, Bondy C. 1993. Anatomy of the insulin-like growth factor system in the human testis. *Fertility and Sterility* 60: 897-904.

75.- Hansson HA, Billig H, Isgaard J. 1989. Insulin-like growth factor I in the developing and mature rat testis: immunohistochemical aspects. *Biol Reprod* 40: 1321-1328.

76.- 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: 1279-1282.

77.- Cassella SJ, Smith EP, Van Wyk JJ, Joseph DR, Hynes MA, Hoyt EC, Lund PR. 1987. Isolation of rat testis cDNAs encoding an insulin-like growth factor I precursor. *DNA* 6: 325-330.

78.- Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellvé AR, Efstratiadis A. 1996. Effects of an IGF I gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 10: 903-918.

- 79.- Ye P, Umayahara Y, Ritter D, Bunting T, Amman H, Rotwein P, D'Ercole AJ. 1987. Regulation of the insulin like growth factor I (IGF-I) gene expression in the brain of transgenic mice expressing an IGF-I luciferase fusion gene. *Endocrinology* 138: 5466-5475.
- 80.- Closset J, Gothot A, Sente B, Scippo ML, Igout A, Vandebroek M, Dombrowics D, Hennen G. 1989. Pituitary hormones dependent expression of insulin-like growth factors I and II in the immature hypophysectomized rat testis. *Mol Endocrinol* 3: 1125-1131.
- 81.- Spiteri-Grech J, Bartlett JMS, Nieschlag E. 1991. Hormonal regulation of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I in adult hypophysectomized rats treated with ethane dimethane sulphonate. *Journal of Endocrinology* 129: 109-117.
- 82.- Bartlett JMS, Spiteri-Grech J, Nieschlag I. 1990. Regulation of insulin-like growth factor I and stage-specific levels of epidermal growth factor in stage synchronized rat testes. *Endocrinology* 127: 747-758.
- 83.- Bernier M, Chatelain P, Mather JP, Saez JM. 1986. Regulation of gonadotropin responsiveness, and cell multiplication by somatomedin-C and insulin in cultured pig Leydig cells. *J Cellular Physiol* 129: 257-263.
- 84.- Borland K, Mita M, Oppenheimer CL, Blinderman LA, Massague J, Hall PF, Czech MP. 1984. The actions of insulin-like growth factors I and II on cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 114: 240-246.

- 85.- Benhamed M, Morera AM, Chauvin MC, de Peretti. 1987. Somatomedin *c*/insulin like factor I as a possible intratesticular regulator of Leydig cell activity. *Mol Cell Endocrinol* 50: 69-77.
- 86.- Moore A, Morris ID. 1993. The involvement of insulin-like growth factor-I in local control of steroidogenesis and DNA sunthesis of Leydig and non-Leydig cells in the rat testicular interstitium. *J Endocrinol* 138: 107-114.
- 87.- Chuzel F, Clark AM, Avallet O, Saez JM. 1996. Transcriptional regulation of lutropin/human choriogonadotropin receptor and three enzymes of steroidogenesis by growth factors in cultured pig Leydig cells. *Eur J Biochem* 239: 8-16.
- 88.- Liu j-P, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-I) and the type-I IGF receptor (Igfr). *Cell* 75: 59-72.
- 89.- Powell-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts-Meek S, Dalton D, Gillet N, Stewart TA. 1993. IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes and Develop* 7: 2609-2617.
- 90.- Baker J, Liu J-P, Robertson EJ, Efstratiadis A. 1993. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75: 73-82.
- 91.- Villalpando-Fierro I, Villafán-Monroy H, Pacheco P. 1996. Delayed expression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) gene in the XY sex-reversed female mouse ovary. *Int J Dev Biol* 40: 477-482.
- 92.- Adashi EL, Resnick CE, Payne DW, Rosenfeld RG, Matsumoto T, Hunter MK, Gargosky SH, Zhou J, Bondy CA. 1997. The mouse intraovarian insulin-like

growth factor I system: departures from the rat paradigm. *Endocrinology* 138: 3881-3890.

93.- Taketo T, Saed J, Roberge S, Matsuo N, Koide S. 1991. Regulation of testicular differentiation and testosterone production in the fetal mouse gonad *in vitro*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 38: 523-531.

94.- McLaren A, Buehr M. 1990. Development of mouse germ cells in cultures of fetal gonads. *Cell Differ Dev* 31: 185-195.

95.- Jeske YWA, Mishina Y, cohen DR, Behringer RR, Koopman P. 1996. Analysis of the role of Amh and Fra 1 in the Sry regulatory pathway. *Mol Reprod Dev* 44: 153-158.

96.- Sambrook J, fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd De. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

97.- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.

98.- Lee C-H, Taketo T. 1994. Normal onset, but prolonged expression, of Sry gene in the B6.Y^{DOM} sex-reversed mouse gonad. *Dev Biol* 165: 442-452.

99.- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

100.- Peterson GL. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more general applicable. *Anal Biochem* 83: 346-356.

101.- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- 102.- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354
- 103.- Leventhal PS, Feldman EL. 1997. Insulin-like growth factors as regulators of cell motility. Signaling mechanisms. *Trends in Endocr Metab* 8:1-6.
- 104.- Ge RS, Hardy MP. 1997. Decreased cyclin A2 and increased cyclin G1 levels coincide with loss of proliferative capacity in rat Leydig cells during pubertal development. *Endocrinology* 138: 3719-3926
- 105.- Hartwell L. 1992. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 71: 543-546.
- 106.- Yoshimura Y, Ando M, Nagamatsu S, Iwashita M, Adachi T, Sueoka K, Miyazaki T, Kuzi N, Tanaka M. 1996. Effects of insulin-like growth factor-I on follicle growth, oocyte maturation, and ovarian steroidogenesis and plasminogen activator activity in the rabbit. *Biol Reprod* 55: 152-160.
- 107.- Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N, Buehr M. 1993. The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol* 37: 407-415.
- 108.- Geduspan JS, Solursh M. 1993. Effects of the mesonephros and insulin-like growth factor I on chondrogenesis of limb explants. *Dev Biol* 156: 500-508.
- 109.- Thiebot B, Bichon-Alne L, Langris M, Bounamy PJ, Barbey P, Carreau S, Bocquet J. 1997. IGF-I stimulates synthesis of undersulfated proteoglycans and hyaluronic acid by peritubular cells from immature rat testis. *Biochim Biophys Acta* 1358: 127-141.

- 110.- Bondy CA, Werner H, Roberts CTJr., LeRoith D. 1990. Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and type I IGF receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-II gene expression. *Mol Endocrinol* 4: 1386-1398.
- 111.- Lodish H, Baltimore DB, Berk A, et al. 1995. *Molecular cell biology*. 3rd ed. Scientific American Books. USA
- 112.- Cooper AA, Stevens TH. 1995. Protein splicing: self-splicing of genetically mobile elements at the protein level. *Trends in Biochem Sci* 20: 351-356.
- 113.- Arkins S, Rebeiz N, Biragyn A, Reese DL, Kelley KW. 1993. Murine macrophages express abundant insulin-like growth factor-I class I Ea and Eb transcripts. *Endocrinology* 133: 2334-2343.
- 114.- Burwen SJ, Jones AL. 1985. The association of polypeptide hormones and growth factors with the nuclei of target cells. *Trends in Biochem Sci* 12: 159-162.
- 115.- Peralta Soler A, Alemany J, Smith RM, de Pablo F, Jarett L. 1990. The state of differentiation of embryonic chicken lens cells determines insulin-like growth factor I internalization. *Endocrinology* 127: 595-603.
- 116.- Li W, Fawcett J, Widmer R, Fielder PJ, Rabkin R, Keller G-A. 1997. Nuclear transport of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in opossum kidney cells. *Endocrinology* 138:1763-1766.