

00346  
1  
dej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ONTOGENIA DE LOS MENSAJEROS DEL FACTOR DE  
CRECIMIENTO SEMEJANTE A INSULINA (IGF) EN EL OVARIO  
DEL RATON B6Y<sup>POS</sup>: ENFOQUE MORFOLOGICO Y MOLECULAR

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS**  
(BIOLOGIA CELULAR)

PRESENTA

**MARIA EUGENIA AGUILAR MENDOZA**

DIRECTORA DE TESIS:  
DRA MARIA IRMA VILLALPANDO FIERRO

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Embriología Molecular perteneciente al Departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra María Irma Villalpando Fierro.

## **AGRADECIMIENTOS:**

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico por la beca otorgada para realizar esta tesis, así como por el donativo IN20-4193 que sirvió para apoyar parcialmente el desarrollo de este trabajo.

A la Fundación Rockefeller por el donativo para realizar parte de esta investigación.

Al Programa Latino Americano de Capacitación e Investigación en Reproducción Humana (PLACIRH) por la beca otorgada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca recibida para realizar los estudios correspondientes a la Maestría.

Al Biólogo Horacio Villafán Monroy por su ayuda en la identificación de las hembras.

Al técnico académico José Guadalupe Baltazar por la realización de los cortes para microscopía electrónica.

## ÍNDICE

<b>I. RESUMEN</b>	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	2-3
1. Desarrollo del ovario	4
1.1 Formación de la cresta gonadal	4
1.2 La gónada indiferenciada	4-5
1.3 Diferenciación morfológica y funcional del ovario	5
a) Iniciación de la meiosis	5
b) Foliculogénesis	5-6
c) Diferenciación del tejido esteroidogénico	7
2. Esteroidogénesis	7-9
2.1 Reversión sexual en el ratón B6Y <sup>POS</sup>	10
a) Aspectos genéticos	10
b) Características del ovario XY	10-11
3. Factores de crecimiento tipo insulina I y II	11-12
3.1 Síntesis y secreción	12
3.2 Expresión diferencial	12-13
3.3 Receptores	13
3.4 Proteínas de unión	14
3.5 Efectos del IGF-I y II sobre la esteroidogénesis ovárica	14-15
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS</b>	16

<b>IV. OBJETIVOS</b>	17
<b>V. MATERIALES Y METODOS</b>	18
1. Reactivos	18
1.1 Animales	18
1.2 Marcado de la sonda 145SC5	18
1.3 Identificación de las hembras XY	18-19
1.4 Hibridación	19
2. Microscopía de luz y electrónica	19-20
3. Inmunocitoquímica	20
4. Extracción de RNA	21-22
4.1 Diseño de oligonucleótidos sintéticos	23
4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23-25
4.3 Visualización de los productos amplificados	25
<b>VI. RESULTADOS</b>	26
1. Análisis histológico y ultraestructural del ovario XY	26-33
1.1 Inmunolocalización del IGF-I	34-37
1.2 Detección del RNAm del IGF-II en ovarios prenatales	38
1.3 Detección del RNAm del IGF-I en ovarios postnatales	39
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	40-46
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	47
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA CITADA</b>	48-55
<b>X. APÉNDICE</b>	56-59

## I. RESUMEN

Durante el desarrollo gonadal numerosos factores tanto autócrinos como exócrinos intervienen en llevar a cabo la morfo-diferenciación del ovario; uno de ellos es el factor de crecimiento semejante a insulina (IGF). Algunos de los péptidos de este conjunto son el IGF-I y II, antes conocidos como somatomedina-C y MSA por sus siglas en inglés ("multiplication stimulation activity" o actividad estimuladora de la multiplicación). Varios estudios han demostrado que estos factores se expresan alternativamente, el IGF-II en la etapa embrionaria y el IGF-I en la vida postnatal, de manera tejido-específica, debido a lo cual son considerados como reguladores específicos durante el desarrollo. En esta investigación se estudiaron los ovarios de hembras XX y XY derivadas de la retrocruza de ratones Mus musculus poschiavinus y Mus musculus musculus, las cuales presentan un cuadro de características anormales como: 1) la presencia de ovarios pequeños, 2) baja producción de hormonas esteroides y 3) infertilidad. Se estudiaron los ovarios de 12 a 18 días de gestación (dg) y de 1 a 20 días postparto (dpp), por medio de las técnicas de microscopía de luz y electrónica, inmunocitoquímica y detección del RNAm del IGF-I y II con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se observó que los ovarios de las hembras XY desde los 14 dpp hasta los 21 dpp presentan un arreglo de los componentes celulares muy diferente al de los ovarios normales, debido a la presencia de cordones medulares formados internamente por células parecidas a las de la granulosa y externamente por células semejantes a las de la teca. Asimismo, se observó que el RNAm para el IGF-II en el ovario XX se expresa desde los 12 dg y posteriormente se mantiene en todas las etapas estudiadas. En el ovario XY la presencia de este mensajero se detectó a los 13 dg y además se vio que a los 18 dg hay una disminución del mismo. El estudio del IGF-I en la etapa postnatal en el ovario XX se visualizó desde el primer dpp y se mantuvo en las etapas subsecuentemente estudiadas, en cambio en el ovario XY su producción inicia hasta los 15 dpp. Por inmunocitoquímica se vio que el IGF-I se localizó en las células de la teca y en el intersticio del ovario XX. En el ovario XY se observó el mismo patrón de tinción en la corteza, excepto que hay una reacción débil alrededor de los cordones medulares en las células parecidas a las de la teca. Con los resultados obtenidos anteriormente, se plantea que el retraso del IGF-I en la vida postnatal pudiera ser en parte responsable de la baja producción de esteroides gonadales, la falta de ciclicidad y los problemas de esterilidad en la hembra XY adulta.

## II. INTRODUCCIÓN

La diferenciación sexual gonadal en los vertebrados es un proceso que tiene lugar durante la etapa embrionaria. Su desarrollo hacia ovario o testículo depende del sexo genético "XX" o "XY" que es determinado en la fecundación (Kofman-Alfaro y col, 1982 revisión). La presencia del cromosoma "Y" se ha asociado a la diferenciación del testículo, ya que en su ausencia la gónada se diferencia hacia ovario (Jost y col, 1973). Las primeras explicaciones plantearon que uno o más genes en el cromosoma "Y" participaban en el desarrollo del testículo (Eicher y col, 1982). Actualmente se sabe que el factor determinante de la diferenciación del testículo es el denominado SRY en humanos (sex determining region of the Y) y Sry en otros vertebrados (Tiersch y col, 1991), el cual se localiza en el brazo corto del cromosoma "Y" dentro de una región de 35 Kilobases (Kb) de longitud (Figura 1). También se sabe que se encuentra presente como una sola copia en todo el genoma.

Aparentemente este gen desencadena una cascada de expresión génica, caracterizada por fenómenos morfológicos y bioquímicos que conllevan al desarrollo de la gónada masculina. Cuando algún inductor de la diferenciación testicular no interacciona adecuadamente en el tiempo y el espacio, se observa la formación de individuos XY que poseen ovarios bilaterales o presentan hermafroditismo, tal es el caso de los ratones B6Y<sup>POS</sup> con los que se realizó este estudio. Además de la participación de los elementos genéticos, se considera que existen inductores intragonadales y extragonadales (factores de crecimiento y hormonas esteroideas) que se cree tienen una función muy importante durante la diferenciación y el desarrollo de las gónadas. De tal manera que el desarrollo gonadal completo se considera como la interacción de múltiples factores, mismos que inician su actividad en la etapa embrionaria y continúan en la vida postnatal. Sin embargo, aún es poco lo que se conoce sobre los mecanismos por medio de los cuales se lleva a cabo la diferenciación gonadal.



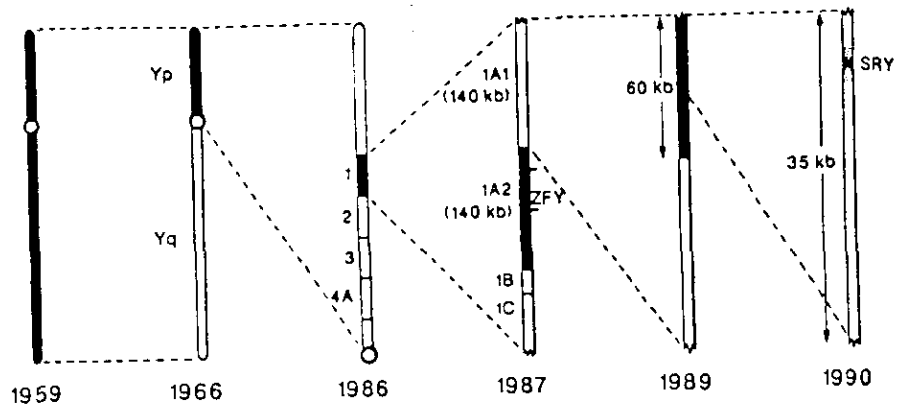


Figura 1. Evolución cronológica de la localización de la región determinante del testículo (McI aren, 1991).

## **1. Desarrollo del ovario**

### **1.1 Formación de la cresta gonadal**

Las gónadas (ovario o testículo) se desarrollan a partir de la interacción de dos líneas celulares: la somática y la germinal primordial (CGP); esta última da lugar a la formación de ovocitos y espermatozoides. McLaren en 1985, menciona que probablemente estas células derivan del epiblasto del macizo celular interno del blastocisto. Las CGP se han localizado en la base del alantoides a los 8.5 días de gestación (dg) y después son llevadas hacia el intestino medio por movimientos morfogenéticos. A partir de esta región las CGP inician un movimiento activo por medio de la formación de pseudópodos, filopodios y lobopodios (Clark y Eddy, 1975); hasta llegar al mesenterio dorsal donde colonizan la cresta urogenital (Byskov y Hoyer., 1988 revisión). En el trayecto las CGP proliferan e incrementan su número de 10 o 100 células inicialmente en el alantoides, hasta 10,000. Además de las CGP, la gónada esta constituida por células somáticas mesenquimatosas que provienen del área del mesonefros; las cuales proliferan y contribuyen a la formación del blastema gonadal, que está situado en la parte ventromedial del mesonefros. En el caso del ovario el blastema gonadal se organiza en dos componentes: a) el epitelial, que contiene a las CGP rodeadas por células precursoras de la granulosa; y b) el estroma, formado por células mesenquimáticas que originarán al tejido conectivo, los vasos sanguíneos y al tejido intersticial esteroideogénico (células de la teca y la glándula intersticial).

### **1.2 La gónada indiferenciada**

Una etapa anterior a la diferenciación sexual es la fase de gónada indiferenciada, la cual es común a machos y hembras. En el proceso de morfogénesis gonadal las interacciones epitelio-mesénquima participan de manera activa y pueden resumirse en los siguientes acontecimientos:

- 1) Proliferación de células epiteliales y estromáticas.
- 2) Segregación del tejido epitelial y estromático por una lámina basal.

3) *Subdivisión del componente epitelial en áreas internas y externas.*

4) *Interacciones específicas entre el área interna, externa y el estroma que los rodea.*

### **1.3 Diferenciación morfológica y funcional del ovario.**

Para que la diferenciación morfológica y funcional del ovario proceda, se requieren tres acontecimientos: a) la iniciación de la meiosis (McLaren, 1985 revisión), b) la formación de folículos (Merchant, 1975; Merchant y Centeno, 1981; Muller y Urban, 1981) y c) la diferenciación del tejido esteroideogénico.

a) *Iniciación de la meiosis.*

Hay dos patrones de diferenciación ovárica que dependen de que las CGP lleven a cabo meiosis "inmediata" (ratón, rata y hamster) sin la producción previa de esteroides, o meiosis "retardada" (cerdo, oveja, perro y vaca) con secreción de esteroides antes de que comience la meiosis. En la meiosis inmediata las CGP inician este fenómeno después de que el sexo gonadal se reconoce morfológicamente. El ovario de ratón inicia la meiosis a los 16 o 17 dg, se detiene en la profase tardía de la primera fase meiótica y continúa en la ovulación (Byskov y Hoyer, 1988 revisión).

b) *Foliculogénesis*

La unidad funcional del ovario de los mamíferos es el folículo. El proceso de foliculogénesis se lleva a cabo por medio de una fragmentación de los cordones epiteliales ovígeros, en los que cada ovocito es envuelto por una capa de células epiteliales delimitada por una lámina basal (Gore-Langton y Armstrong, 1988 revisión).

Los mecanismos moleculares que disparan el crecimiento folicular inicial se desconocen; sin embargo, se sabe que el origen embrionario de los tipos celulares que conforman al folículo es diferente. Las células de la granulosa derivan principalmente del epitelio celómico y las células mesenquimáticas provienen del área vecina al mesonefros. Por su parte las células de la teca parecen diferenciarse de células mesenquimatosas del estroma ovárico (Merchant y Centeno, 1981).

En 1989, Merchant y Chimal-Monroy (Fig 2), propusieron tres etapas en la formación de los folículos:

i) Etapa I o de ovocito

Los cordones ovígeros están formados por acúmulos de ovocitos en contacto directo entre sí. Alrededor de éstos se encuentran las células epiteliales separadas del estroma por una lámina basal.

ii) Etapa II o de célula epitelial

Los ovocitos empiezan a ser separados por prolongaciones citoplásmicas de las células epiteliales dentro de los cordones sexuales.

iii) Etapa III o de célula estromática

Los ovocitos junto con las células epiteliales y la lámina basal que los rodea son individualizados por tejido estromático. La etapa final de la foliculogénesis es la formación de las tecas en torno a la lámina basal, lo cual separa por completo a cada entidad.

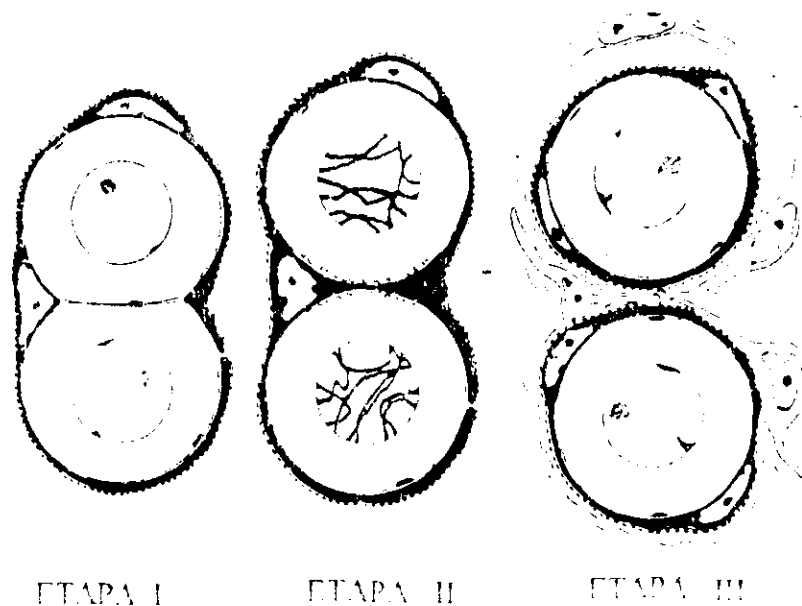


Figura 2 Etapas del desarrollo del folículo (Merchant y Chimal-Monroy, 1989).

### c) Diferenciación del tejido esteroideogénico.

La interacción de las células germinales con las células epiteliales y estromáticas es muy importante para la formación de los folículos y la diferenciación del tejido esteroideogénico. En el ovario, los estudios realizados con busulfán (droga que destruye selectivamente a las CGP), demostraron que la morfogénesis ovárica se detiene en la etapa de formación de los cordones epiteliales. Evitando así la diferenciación de las células productoras de esteroides y como consecuencia de ello la gónada permanece como una estructura indiferenciada de aspecto embrionario (Merchant, 1975 y 1976).

## 2. Esteroidogénesis

En los mamíferos los tipos celulares que participan en la esteroidogénesis ovárica son las células de la teca interna, las células intersticiales del estroma que responden a la LH y las células de la granulosa que son estimuladas por la FSH (Gore-Langton y Armstrong, 1988 revisión). En el ovario los esteroides son sintetizados por estas células a partir del colesterol derivado de una de las siguientes fuentes: 1) colesterol preformado tomado de la sangre en forma de lipoproteínas (LDL "low density lipoproteins") circulantes; 2) colesterol libre almacenado en la células como constituyente de la membrana celular o ésteres de colesterol de gotas lipídicas citoplásmicas, y 3) colesterol sintetizado de novo a partir de componentes derivados del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas.

Las hormonas esteroides sexuales sintetizadas a partir del colesterol pertenecen a tres clases principalmente: pregnanos (pregnenolona y progesterona), androstranos y estranos.

El primer paso en la biosíntesis de esteroides (Fig 3) es el rompimiento del colesterol en la unión C21/22 por la 20,22 liasa, que da origen a la pregnenolona. Este complejo multienzimático se localiza en la matriz mitocondrial (Farkash y col, 1986) y tiene tres componentes: 1) La citocromo P450<sub>scc</sub> (aceptor de electrones), 2) La flavin adenin dinucleótido (FAD) que contiene a la flavoproteína y 3) Una proteína sulfurosa con un grupo hemo, la cual funciona como intercambiador de electrones. La pregnenolona es el intermediario esteroideogénico común de todas las hormonas esteroides producidas en los

ovarios. Esta es convertida a progesterona por un complejo enzimático.  $\Delta^{4-5}$ Isomerasa 3  $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSDH), que funcionan como una sola entidad (Hall, 1984). La biosíntesis de andrógenos en el folículo es dirigida por el complejo enzimático  $P_{450\ c17}$  (17  $\alpha$ -hidroxilasa: C17-20 liasa), el cual es un componente de membrana del retículo endoplasmático liso y cataliza la conversión de pregnenolona o progesterona a dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona respectivamente. Este último compuesto es metabolizado hacia testosterona por la 17  $\beta$ HSDH, o hacia estrógenos como la estrona y el 17 $\beta$  estradiol gracias a la acción de la aromatasa  $P_{450}$ . Esta última es un complejo enzimático localizado en la membrana del retículo endoplasmático liso de las células esteroideogénicas y se le conoce como aromatasa debido a la estructura aromática de sus productos.

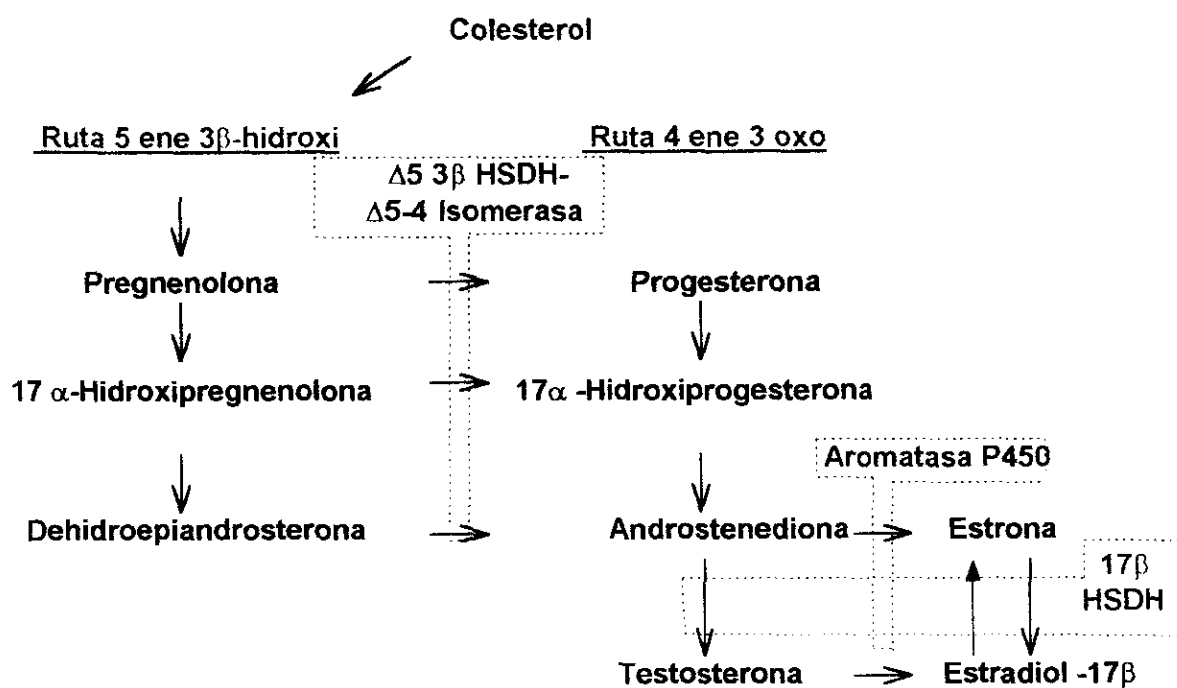


Figura 3. Esquema de las principales rutas metabólicas esteroidogénicas en el ovario de mamíferos.

## 2.2 Reversión sexual en el ratón B6Y<sup>POS</sup>.

### a) Aspectos genéticos

El cromosoma Y determina la diferenciación del testículo. Sin embargo, cuando un macho Mus musculus poschiavinus se cruza con una hembra Mus musculus musculus C57BL/6J (B6), todos los machos F1 son normales. La retrocruza de los machos de esta generación con hembras B6 hacia la cuarta generación, da origen a individuos XY que se desarrollan como hermafroditas, ya que poseen tanto tejido ovárico como testicular (ovotestis) y hembras XY con ovarios bilaterales. En la vida fetal los testículos se desarrollan según el tamaño del componente testicular del ovotestis. Se ha propuesto que un gen dominante presente en la cepa Mus musculus poschiavinus (Y<sup>POS</sup>) interacciona inadecuadamente con un gen o grupo de genes recesivos que determinan el sexo de la cepa B6, lo cual ocasiona la interrupción de los pasos iniciales en la determinación del testículo y por lo tanto la diferenciación normal testicular no ocurre (Eicher y col, 1982 y Nagamine y col, 1987).

### b) Características del ovario XY

La morfología de los ovarios XY es similar a los de la hembra XX hasta los 16 dg. Posteriormente a esta etapa, los ovarios XY presentan un incremento paulatino en la degeneración de los ovocitos (17 dg), lo cual provoca la presencia de cordones medulares carentes de células germinales después del nacimiento. Algunos ovocitos localizados en la corteza sobreviven y más tarde (en la vida postnatal) forman folículos.

Durante las primeras semanas de vida postnatal, en los ovarios XX se observa *crecimiento folicular en la zona medular, folículos atrésicos y actividad esteroidogénica de la enzima  $\Delta^{4-5}$  3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $\Delta^{4-5}$  3 $\beta$ HSDH)*. Esta actividad se ubica en las células estromales, alrededor de los folículos en crecimiento de la región medular. En cambio, en los ovarios XY la pérdida prenatal de los ovocitos en la zona medular provoca una localización anormal del tejido esteroidogénico (Taketo-Hosotani y col, 1989), de tal forma que la actividad de la  $\Delta^{4-5}$  3 $\beta$ HSDH se localiza primordialmente en los cordones medulares del ovario infantil XY. Las células foliculares y de la teca de



los folículos corticales dan una reacción más débil. Asimismo, la producción de esteroides como progesterona, testosterona y 17  $\beta$  estradiol está disminuída (Villalpando y col, 1993).

### 3. Factores de crecimiento tipo insulina I y II

En el ovario se han identificado polipéptidos pertenecientes a las diferentes familias de factores de crecimiento capaces de modular la diferenciación gonadal (Adashi y col, 1985), entre éstos se encuentra el EGF (epidermal growth factor), TGF- $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ), IGF, inhibina, activina, TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) y FGF (fibroblast growth factor).

Entre los factores de crecimiento intraováricos, el IGF es de particular interés debido a las funciones que ejerce y a su regulación en el desarrollo de este órgano (Adashi, 1993). La familia de los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGF) consiste de un grupo heterogéneo de péptidos con efectos promotores del crecimiento tanto *in vitro* como *in vivo*. Los dos péptidos biológicamente activos son el IGF-I (Somatomedina C) y el IGF-II "Multiplication Stimulating Activity" o MSA. Su nombre se debe a la alta similitud que presentan con la molécula de insulina, que es del 43 y 41 % respectivamente (Zapf y Froesch, 1986), mientras que entre ellos poseen una similitud del 62% (Clemmons, 1989).

El IGF-I consiste de 70 residuos de aminoácidos (aa) y tiene un peso molecular de 7,649 (Rinderknecht y Humbel., 1976 y 1978); por su parte el IGF-II consta de 67 residuos de aa que le confieren un peso molecular de 7,441 (Clemmons, 1989). Los procesos celulares en los que participa el IGF-I son muy variados, éstos dependen del tipo celular del que se trate y de la etapa de desarrollo del órgano en cuestión. Sin embargo, se pueden mencionar algunos de sus efectos: incremento en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, multiplicación celular, amplificación de la biosíntesis de esteroides y diferenciación celular (Hill, 1979; Veldhuis y Hammond, 1979; Turo y Florini, 1982; Hall y Sara, 1983; Clemmons, 1984; Schmid y col, 1984; Clemmons y Van Wyk, 1985; Froesch y col, 1985 y Elgin y col, 1987). Su función como inductor de la proliferación celular en el folículo es crucial para el desarrollo y la diferenciación final del mismo, ya

que aparentemente actúa como un integrador del desarrollo folicular y como selector del o de los folículos dominantes (Holly y Wass, 1989). Estos efectos dependen a su vez de diversos factores reguladores tales como la hormona de crecimiento (Spatola y col, 1991), la gonadotropina coriónica, estrógenos, andrógenos y glucocorticoides (Hall y Sara, 1983; Froesch y col, 1985; Holly y Wass, 1989; Levinovitz y Norstedt, 1989 y Adashi y col, 1990).

### 3.1 Síntesis y secreción

Se ha observado que numerosos tipos celulares *in vitro* e *in situ* secretan péptidos del tipo IGF (Hill, 1979; Turo y Florini, 1982 y Schmid y col, 1984). Estos son producidos como precursores inactivos y posteriormente requieren de un procesamiento proteolítico en ambos extremos que da lugar a las formas maduras (Jansen y col, 1983).

IGF-I: Pre-pro-IGF-I Proteína de 130 aa

IGF-I Forma madura de 70 aa

IGF-II: Pre-pro- IGF-II Proteína de 180 aa

IGF-II Forma madura de 67 aa

Tanto la secuencia de aminoácidos del IGF como su RNAm se encuentran altamente conservadas en los mamíferos (Daughaday y Rotwein, 1989), lo cual apoya la idea sobre su función como moléculas reguladoras. Los genes del IGF-I comprenden seis exones (1 a 6) que se extienden a lo largo de 70 kb de DNA genómico. El principal gen del IGF-I consta de 7,236 pares de bases (pb) seguidas por un extremo poli A (Steenberg y col, 1991 y Hoyt y col, 1992). Los genes del IGF-I y II se localizan en el brazo largo del cromosoma humano 12 y en el corto del cromosoma 11 respectivamente (Brissenden y col, 1984 y Bell y col, 1985).

### 3.2 Expresión diferencial

La presencia de la proteína y del RNAm del IGF-II se ha demostrado desde la etapa de dos células y posteriormente en derivados del trofoectodermo poco después de la implantación (Lee y col, 1990), así como en mesodermo de embriones y ratas recién

nacidas (Beck y col, 1987 y 1988). Más tarde el IGF-II se localiza en órganos blanco (Moses y col, 1980; Brown y col, 1986; Bondy y col, 1990; Spaventi y col, 1990 y Telford y col, 1990).

En los roedores (rata, conejo) el único gen del IGF-II utiliza al menos tres promotores, uno de éstos produce un transcrito fetal de 5.6 kb (De Pagter-Holthuisen y col, 1987). La activación de este promotor aparentemente termina al final de la gestación y poco después del nacimiento los niveles del RNA y proteína IGF-II declinan hasta concentraciones mínimas (Levinovitz y Norstedt, 1989 y Han y col, 1992). Los genes del IGF-I también se expresan en el desarrollo de manera tejido-específica, pero al contrario del IGF-II la cantidad de IGF-I se incrementa paulatinamente después del nacimiento (Levinovitz y Norstedt, 1989). Se ha planteado que el IGF-II es la contraparte fetal del IGF-I y funciona como un factor de crecimiento específico en la etapa embrionaria y fetal.

### 3.3 Receptores

El receptor para IGF-I es una proteína del tipo I conformado por una glucoproteína integral que consta de dos subunidades alfa (dominio de unión al ligando) extracelulares y dos beta (dominio tirosin-cinasa) intracelulares unidas por enlaces disulfuro (Adashi y col, 1988). El receptor se une preferentemente al IGF-I, con menor especificidad al IGF-II y finalmente a insulina (LeRoith y col, 1993).

El receptor para IGF-II se encuentra en casi todos los tipos celulares y consiste de una cadena monomérica plegada por enlaces disulfuro. Su estructura es idéntica a la del receptor para manosa-6-fosfato. Este es una proteína multifuncional que se enlaza al azúcar y al IGF. Se acopla principalmente al IGF-II, luego al IGF-I y no se une a insulina (Ballesteros y col, 1990 y LeRoith y col, 1993). Los estudios con anticuerpos han demostrado que el IGF-I y II median sus efectos promotores del crecimiento por medio del receptor tipo I y no del tipo II (Kiess y col, 1987), por lo que la función de este último se desconoce (Czech, 1989 y Ballesteros y col, 1990).

### 3.4 Proteínas de unión

Los IGF - I y II se encuentran unidos a proteínas acarreadoras (IGF- Binding proteins o IGF-BP) secretadas por el hígado (Froesch y col, 1985 y Camacho-Hubner y col, 1992). La presencia de éstas explica la vida media larga de los IGF, que alcanza 4 horas en la rata (Froesch y col., 1985). Existen varios tipos de IGF-BP con distinta afinidad para el IGF-I y II (Binoux y col, 1986 y Nakatani y col, 1991). Una de las proteínas de unión al IGF presenta una región de secuencia Arg-Gly-Asp, importante en el anclaje celular de proteínas de la matriz extracelular, lo cual sugiere la existencia de una relación IGF-BP-célula (Clemmons, 1989). Al parecer tanto la hormona del crecimiento como el propio IGF-I influyen en la producción y secreción de la subunidad mayor de las proteínas de unión a IGF (Binoux y col, 1986).

### 3.5 Efectos del IGF-I y II sobre la esteroidogénesis ovárica

Los IGF- I y II son considerados como factores diferenciadores de la función ovárica (Adashi y col, 1984 y Veldhuis y col, 1986). Las células de la granulosa son sitio de síntesis, producción y acción del IGF-I (Hammond y col, 1985 y Adashi y col, 1986), en tanto que las células de la teca y las intersticiales aparentemente sólo son sitios de recepción y acción del mismo (Hernández y col, 1988). La estimulación en la producción de progesterona es mediada por el IGF-I y se lleva a cabo a distintos niveles de la ruta esteroidogénica en las células de la granulosa, los cuales incluyen:

- 1) Síntesis de novo de esteroides celulares.
- 2) Incremento en el número de receptores celulares a LDL sin cambio en su afinidad.
- 3) Aceleración de la internalización y degradación de LDL.
- 4) Acumulación de colesterol intracelular.
- 5) Incremento en la concentración de la enzima P450<sub>ssc</sub>.

En el ovario el IGF-I es capaz de modificar la inducción del receptor a LH. Sin embargo, no se ha comprobado la existencia de una ruta común entre éste y las gonadotropinas para estimular la síntesis del DNA y la esteroidogénesis en células de la granulosa (Roy y Greenwald, 1991). Asimismo, la secreción del IGF-I parece ser dependiente de la FSH y de los estrógenos (Adashi y col, 1990 y Murphy y col, 1987).

Algunos estudios sugieren que el IGF promueve la esteroidogénesis por medio del complejo enzimático aromatasa, que se encuentra presente en las células de la granulosa. La actividad de aromatasa en células de la granulosa expuestas a FSH o a HCG se incrementa de manera significativa (Christman y col, 1991), debido al aumento en los niveles del RNAm del P450scc (Urban y col, 1990). Christman y col, en 1991 sugieren que las cantidades fisiológicas del IGF-I elevan la actividad de esta enzima en células foliculares y potencian los efectos estimulatorios de la FSH. Al parecer este efecto es dosis-dependiente y está relacionado con el grado de madurez del folículo (Shaw y col., 1993).

Los estudios de hibridación *in situ* en ovarios de rata han demostrado que el RNAm del IGF-I se expresa en las células de la granulosa de folículos (preantrales y antrales), pero no en las células de la teca, cuerpo lúteo y folículos atrésicos (Oliver y col, 1989 y Hernández y col, 1989). A pesar de que el IGF-I no tiene ningún efecto sobre la biosíntesis de los andrógenos en las células de la teca y las intersticiales, se ha observado que induce la síntesis de receptores a LH, y de manera indirecta eleva la producción de andrógenos (Hernández y col, 1988). Además el IGF-I sinergiza con la LH e incrementa el contenido de P450scc y de P45017 $\alpha$  (17  $\alpha$ -hidroxilasa/C17-20 liasa) (Urban y col, 1990). El IGF-I incrementa la actividad del rompimiento de la cadena lateral del colesterol, que lleva a cabo la P450scc, al aumentar el contenido de esta enzima y sus niveles de RNAm en las células intersticiales y de la teca (Magoffin y col, 1990).

Se ha visto que el IGF sinergiza con la FSH y estimula la síntesis de proteoglicanos extracelulares (heparina y dermatán sulfato). A éstos se les adjudica un papel en la formación del antro folicular (Hsueh y col, 1984) y la atresia folicular (Bellin y Ax, 1984). Así, es posible que el IGF-I producido en las células de la granulosa pueda participar en el crecimiento y en la muerte del folículo ovárico en desarrollo. Se ha planteado que el IGF actúa en más de un sitio en la biosíntesis de esteroides, al estimular la síntesis de progesterona y estrógenos por medio de la actividad de la aromatasa y de la  $\Delta^{4-5}$  3 $\beta$ -HSDH (Shaw y col, 1993).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

Cuando se cruza la cepa Mus musculus poschiavinus con la cepa Mus musculus musculus, la mitad de la descendencia XY desarrolla ovarios y ovotestis en la vida fetal, pero nunca testículos normales. Algunos machos hermafroditas son fértiles, sin embargo, las hembras XY a pesar de que poseen ovarios bilaterales y desarrollan genitales femeninos internos; producen niveles bajos de esteroides y tienen problemas de esterilidad.

Se ha planteado que la función del ovario en los mamíferos es regulada por factores autócrinos y parácrinos. Entre éstos están los factores semejantes a insulina tipo I y II. El primero se ha relacionado con la diferenciación y función de las células esteroideogénicas del ovario y el segundo con procesos de diferenciación celular. La mayor parte de los estudios sobre la acción del IGF-I en el control de la proliferación celular y como promotor de la esteroideogénesis, se han realizado en células foliculares de ejemplares adultos de ovino, bovino, conejo y rata. A pesar de que el ratón es muy empleado en diversos estudios sobre Biología de la Reproducción, la mayor parte del conocimiento sobre la endocrinología y fisiología del ovario, se ha obtenido de experimentación en ratas. Por otra parte, se desconoce en qué etapa del desarrollo embrionario de los mamíferos, la gónada empieza a producir el IGF-I y II, así como qué elemento o elementos regulan la expresión de los mismos, tanto en la etapa embrionaria como postnatal. El empleo de la hembra XY brinda la oportunidad de analizar el papel que juega el cromosoma Y durante el desarrollo y la función fisiológica del ovario de las hembras XY.

### HIPÓTESIS

Puesto que aparentemente el IGF-I y II son factores autócrinos y/o parácrinos importantes durante el desarrollo embrionario y postnatal; se supone que algunas de las características anormales del ovario XY se deben, posiblemente, a defectos en la expresión, síntesis y/o en la recepción de estos factores.

#### **IV. OBJETIVOS**

1. Determinar los componentes celulares que forman los cordones estériles en el ovario XY de 15 dpp.
2. Localizar por inmunohistoquímica la presencia de IGF-I en ovarios XX (control) y XY de 1, 5, 10, 15 y 20 dpp.
3. Estudiar mediante PCR la ontogenia del RNAm del IGF-I y II en ovarios XY de etapas embrionarias y postnatales.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Reactivos

Todos los reactivos y solventes fueron grado analítico. Las soluciones usadas se describen en el apéndice (página 56-59).

#### 1.1 Animales

Se emplearon los ovarios de ratonas hembras XY de la cepa B6Y<sup>POS</sup> de 12 a 18 dg y de 1, 5, 10, 15 y 20 dpp, mantenidas en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, pertenecientes a la generación 61 a 63.

#### 1.2 Marcado de la sonda 145SC5

Se tomaron 2 µg de la sonda 145SC5 específica para el cromosoma "Y" (Nishioka y Lamothe, 1986 y Nishioka, 1988) y se añadieron 20 µl de H<sub>2</sub>O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), se desnaturalizó a 92°C por 5 minutos y se enfrió a 4°C. Se añadieron los siguientes reactivos de manera secuencial: 15 µl del amortiguador del equipo Random Primer, 2 µl de los deoxinucleótidos dCTP, dTTP, dGTP, 5 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC, 3 µl de <sup>32</sup>P dATP y 1 µl de DNA polimerasa II (fragmento Klenow). Se incubó 2 horas a temperatura ambiente y la reacción se detuvo con 5 µl de amortiguador de paro. La sonda marcada se separó por cromatografía en Sephadex G-50, se tomó una alícuota de 1 ml y se cuantificó en un contador de centelleo Packard Tri-Carb 1500. La lectura se extrapoló al volumen total de la sonda marcada y se realizó la hibridación como se describe a continuación.

#### 1.3 Identificación de las hembras XY

El sexo de las hembras XY se determinó por hibridación del DNA de hígado de embriones y de sangre de hembras de 1 a 20 dpp. Se usó la sonda del DNA 145SC5.

El hígado embrionario se homogeneizó con 0.5 ml de amortiguador SET, se añadió 5 µl de SDS al 10%, 5 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y se agitó en el vórtex.



Posteriormente se incubó a 60°C por 1 hora, se tomaron 5 µl de la muestra y se aplicaron en una membrana "Gene-Screen Plus" Dupont. A las hembras XY se les tomaron 3 µl de sangre de la cola. A partir de este punto se siguió el mismo método para ambas edades.

#### 1.4 Hibridación

La membrana se horneó al vacío 2 horas a 80°C, se colocó en NaOH 0.3 N y NaCl 0.5 M por 1 hora a temperatura ambiente (TA), se neutralizó con Tris 0.1 M pH 7.0 por 1 hora a TA y se prehibridó con solución de prehibridación durante 4 horas a 42°C.

Se añadió la sonda radioactiva y se hibridó 24 horas a 42°C. La membrana se lavó con la solución SSC 2X y SDS al 0.1% 20 minutos a 50°C, después con SSC 0.1X y SDS al 0.1%, 20 minutos a 50°C y se secó. Se colocó en un cassette de autorradiografía con una película X-OMAT de Kodak, se incubó a -70°C durante 3 días y se reveló con métodos estándares.

## 2. Microscopía de luz y electrónica

Se aislaron ovarios XY de 1, 5, 10, 15 y 20 dpp, y se fijaron con solución de Karnovsky (1965) sin calcio 0.1 M pH 7.4 por 2 horas, se lavaron con amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M por 15 minutos y se postfijaron con tetraóxido de osmio (Zetterqvist, 1956) por 1 hora. Las muestras se lavaron con agua destilada por 10 minutos y se deshidrataron con etanol 70, 80, 90 y 95 % durante 20 minutos. Después se realizaron dos cambios con alcohol absoluto y dos con óxido de propileno, cada cambio fue de 20 minutos.

El tejido se preincluyó en una mezcla de óxido de propileno y epón 812 (Luft, 1961) 1:1 por 2 horas, luego se pasó a una mezcla 1:3 durante 2 horas, y se dejó en epón puro 812 por 15 horas.

El tejido se incluyó en epón puro 812 a 60°C y se dejó polimerizar durante 24 horas. Se realizaron cortes de 1 a 2 µm en un microtomo Ultracut Reichter, se tiñeron con azul de toluidina, se montaron en laminillas y se observaron en un microscopio Nikon, modelo HF-X-IIA.

Para microscopía electrónica se obtuvieron cortes de 900 Å y se montaron en rejillas de cobre de malla 200. Se tiñeron con acetato de uranilo 2.5 % por 10 minutos y citrato de plomo 0.3 % por 1 minuto. Se revisaron y fotografiaron en un microscopio electrónico EM-9 de Zeiss.

### 3. Inmunocitoquímica

Se aislaron los ovarios de hembras XY de 1, 5, 10, 15 y 20 dpp y se fijaron con paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos (PB) 0.1 M pH 7.4 por 2 horas a 4°C. Se lavaron con PB durante 20 minutos, se deshidrataron con polietilenglicol (PEG) de peso molecular (PM) 400 al 25 y 50% por 20 minutos a TA y se realizaron dos cambios más de PEG al 75% durante 20 minutos. El tejido se transfirió a PEG, PM 1,000 por 20 minutos a 45°C y finalmente se realizó un cambio a PEG de PM 1,450 por 20 minutos a 45°C. La muestra se incluyó en PEG 1,450, se obtuvieron cortes de 10 µm en un microtomo de parafina y se almacenaron a 4°C.

La Inmunodetección se realizó por flotación, los cortes se incubaron con tritón 0.1% 10 minutos, luego en peróxido de hidrógeno-metanol 50:50 durante 30 minutos. Se enjuagaron con agua destilada por 5 minutos (2 veces) y con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4 - NaCl 0.9% (PBS) por 10 minutos (2 veces). Se incubaron con albúmina bovina al 1% en PBS durante 20 minutos y se enjuagaron con PBS por 10 minutos (3 veces). Se incubó con anti IGF-I/ SMC (UB3-189) obtenido del National Institute of Hormones Research del National Institute of Health (NIH) Bethesda, dilución 1:1000 toda la noche a 4°C. Se enjuagaron con PBS por 10 minutos (3 veces) y se incubó con IgG durante 1 hora a TA. Se enjuagó con PBS por 10 minutos (3 veces) y se incubó con el complejo ABC de Vector Laboratories por 1 hora a TA. Se lavó con PBS (3 veces) y se incubó con 3-3 diaminobencidina tetrahidroclorada en PBS y H<sub>2</sub>O al 0.2% durante 5 minutos en oscuridad.

Finalmente los cortes se lavaron con agua destilada 10 minutos (3 veces), se dejaron secar, se montaron sobre un portaobjetos con glicerol y se observaron en un microscopio óptico Nikon HF-X-IIA. El control se realizó al incubar los cortes con una solución de IGF-I 10<sup>-6</sup> M.

#### 4. Extracción del RNA

El método empleado para la extracción del RNA fue el reportado por Chomczynski y Sacchi, 1987 (ver diagrama de flujo 1).

Se aislaron las gónadas de 12 a 18 dg y de 1, 5, 10, 15 y 20 dpp, y se agregó la solución desnaturizadora "D" (ver apéndice). El tejido se homogeneizó a 4°C y se añadieron las siguientes soluciones de manera secuencial: acetato de sodio 2M pH 4.0, fenol saturado con H<sub>2</sub>O-DEPC y cloroformo-alcohol isoamílico 49:1. Se incubó a 4°C por 15 minutos, y se centrifugó a 12,000 g durante 20 minutos a 4°C. La fase acuosa se separó y se añadió un volumen igual de isopropanol, se precipitó 1 hora a -20°C o 30 minutos a -70°C, se centrifugó a 12,000 g por 20 minutos a 4°C y se decantó. El precipitado se disolvió en solución "D", se añadió un volumen igual de isopropanol y se precipitó 1 hora a -20°C o 30 minutos a -70°C. Se centrifugó a 12,000 g, se enjuagó con 100 µl de etanol al 75% y se centrifugó a 12,000 g 10 minutos a 4°C, este paso se repitió dos veces. Se decantó la solución y la pastilla se secó en un desecador a 4°C. Se resuspendió en 5 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC y se leyó la concentración del RNA mediante espectrofotometría a 260-280 nm. El RNA aislado se almacenó a -70°C. En el caso de tejido embrionario se omitió la lectura en el espectrofotómetro debido a la pequeña cantidad del RNA total obtenido.

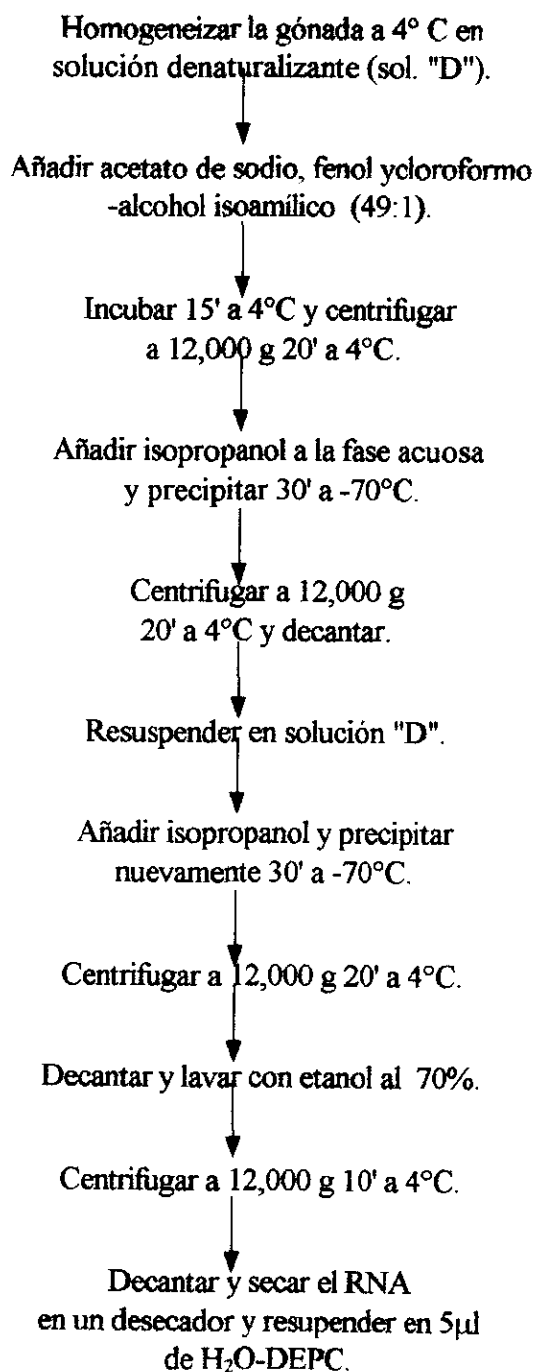


Diagrama de flujo 1. Extracción de RNA.

#### 4.1 Diseño de oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos sintéticos fueron sintetizados en la Unidad de Análisis de Aminoácidos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se diseñaron dos oligonucleótidos. Uno en dirección 5' → 3' ("downstream") denominado P1 y el otro en dirección 3' → 5' ("upstream") P2 con base en la secuencia de nucleótidos publicada de los cDNA murinos del IGF-I (Bell y col, 1986) y II (Stempien y col, 1986).

IGF-I:

P1 5' GGA-CCA-GAG-ACC-CTT-TGC 3'

P2 3' CTT-CAG-TGG-GGC-ACA-GTA 5'

IGF-II:

P1 5' GGA-GGG-GAG-CTT-GTT-GAC 3'

P2 3' ACA-GTA-TGT-CTC-CAG-GAG 5'

Los oligonucleótidos tuvieron una longitud de 18 pares de bases y se mantuvieron liofilizados a -20°C. Se suspendieron en 250 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC y se leyó su concentración en el espectrofotómetro a 260 nm. Posteriormente se realizaron los cálculos necesarios para emplear la cantidad que se utilizó en el PCR (Sambrook y col, 1989).

#### 4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se empleó el equipo de Gene Amplification RNA-PCR de Perkin Elmer Cetus y el protocolo señalado por el mismo.

Se obtuvo el cDNA a partir del RNA total con la transcriptasa reversa, se desnaturalizó el RNA a 90°C, 5 minutos, se enfrió a 4°C y se añadieron los siguientes reactivos de manera secuencial: 4 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µl de amortiguador II PCR 10 X pH 8.3, 1 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC, 2 µl de DGTP 10 mM, 2 µl de dATP 10 mM, 2 µl de dTTP 10 mM, 2 µl de dCTP 10 mM, 1 µl de inhibidor de RNAsa 20 U/µl, 1 µl de

Transcriptasa reversa 50 U/ $\mu$ l, 1  $\mu$ l de exanucleótidos con secuencia al azar 50  $\mu$ M y 5  $\mu$ l de RNA.

Los tubos se incubaron en el termociclador con el ciclo #1 (Tabla 1): 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 99 °C y 5 minutos a 4°C, después se agregaron los siguientes reactivos de manera secuencial: 4  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 8  $\mu$ l de amortiguador II PCR 10X pH 8.4, 65.5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-DEPC y 0.5  $\mu$ l de Ampli Taq DNA.

Se añadieron 40 pM del oligonucleótido P1 (downstream) y 40 pM del oligonucleótido P2 (upstream). Se incubó nuevamente en el termociclador con el ciclo #2, que consta de tres partes (Tabla 2): 2 minutos a 94°C, 15 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C. La segunda parte del ciclo se repitió 28 veces, ésto fue: 15 segundos a 94°C, 15 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C. La última parte del ciclo se realizó sólo una vez: 15 segundos a 94°C, 15 segundos a 55°C y 10 minutos a 72°C. En total se realizaron 30 ciclos. Los productos amplificados se almacenaron a -20 °C.

Tabla 1 (Ciclo #1):

TIEMPO	TEMPERATURA
10'	25 °C
30'	42 °C
5'	99 °C
5'	4°C

Tabla 2 (Ciclo #2):

TIEMPO	TEMPERATURA
2'	94 °C
15"	55 °C
30"	72 °C
5'	4°C

TIEMPO	TEMPERATURA
15"	94 °C
15"	55 °C
30"	72 °C

TIEMPO	TEMPERATURA
15"	94 °C
15"	55 °C
10'	72 °C

#### 4.3 Visualización de los productos amplificados

Se tomaron 20  $\mu$ l de los productos de PCR amplificados y se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 1X. Se pusieron 2  $\mu$ l del colorante azul de bromofenol para PCR y se aplicaron al gel. Se corrió a 100 Volts durante 3 horas, se tiñó con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml) por 15 minutos y se observó en un transiluminador de luz ultravioleta.

## VI. RESULTADOS

### 1) Análisis histológico y ultraestructural del ovario XY.

Durante las primeras semanas de vida postnatal, el ovario XX (control) presenta numerosos ovocitos tanto en la zona cortical como en la medular, estos últimos se encuentran formando parte de folículos en diversos estados de desarrollo (Figura 4). En cambio, el ovario XY posee ovocitos sólo en la región cortical, mientras que la zona central presenta cordones medulares carentes de ovocitos debido a su pérdida durante la etapa embrionaria (Figura 5). Hacia los 15 dpp el ovario XX posee grupos de ovocitos en la corteza, y en la médula la foliculogénesis se lleva a cabo normalmente (Figura 6). En esta misma etapa el ovario XY no desarrolla folículos en la zona medular, los únicos que crecen y forman folículos son los ubicados en la región cortical, aunque muchos de éstos mueren posteriormente, razón por la cual a los 70 dpp el ovario está completamente depletado de ovocitos (datos no mostrados). También se observa que los cordones medulares en el ovario XY están formados en su interior por células esteroidogénicas parecidas a las de la granulosa, tanto por sus características a nivel de microscopía óptica (Figura 7) como ultraestructural (Figura 8), y externamente están integrados por células semejantes a las de la teca que poseen un núcleo irregular con zonas heterocromáticas (Figura 8).

Mediante técnicas de microscopía electrónica, se observa que en el ovario XY algunas células de la granulosa de los folículos corticales están proliferando (Figura 9). Estas células poseen un núcleo grande y redondo, con zonas visibles de heterocromatina y gotas lipídicas (Figura 10). Las células de la teca que se encuentran rodeando los folículos son de tipo fusiforme, tienen núcleos alargados y en su citoplasma se observan gotas lipídicas y mitocondrias (Figura 10).



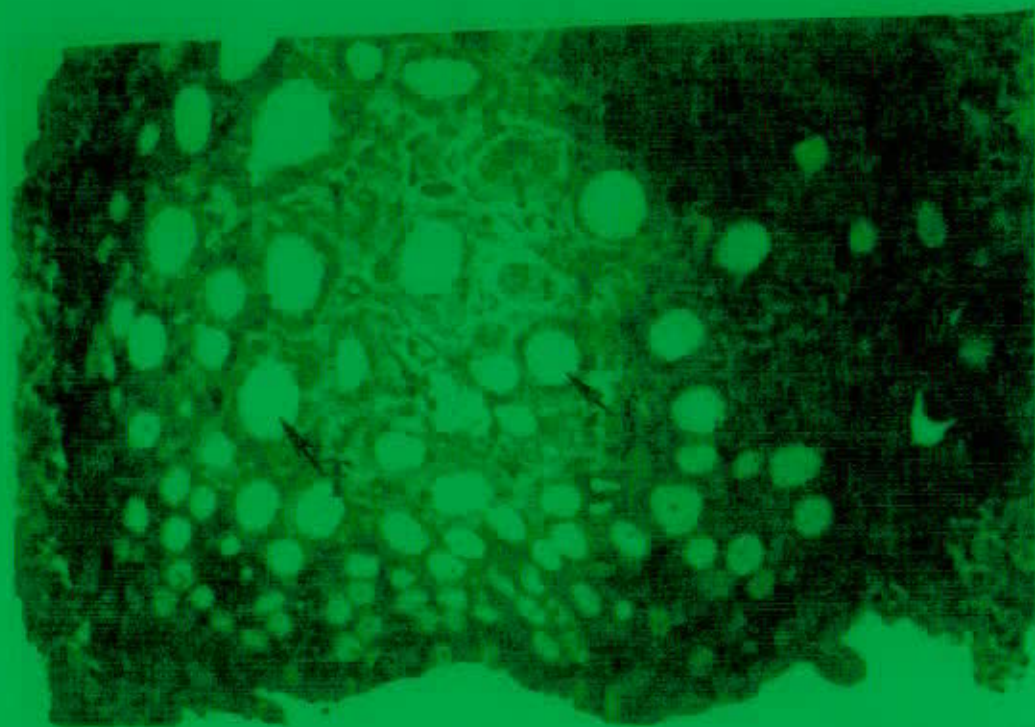


Figura 4. Ovario XX de 5 dpp. Se observan grupos de ovocitos en la corteza (c) y varios folículos (f) en diferentes etapas de desarrollo en la zona medular (400X).

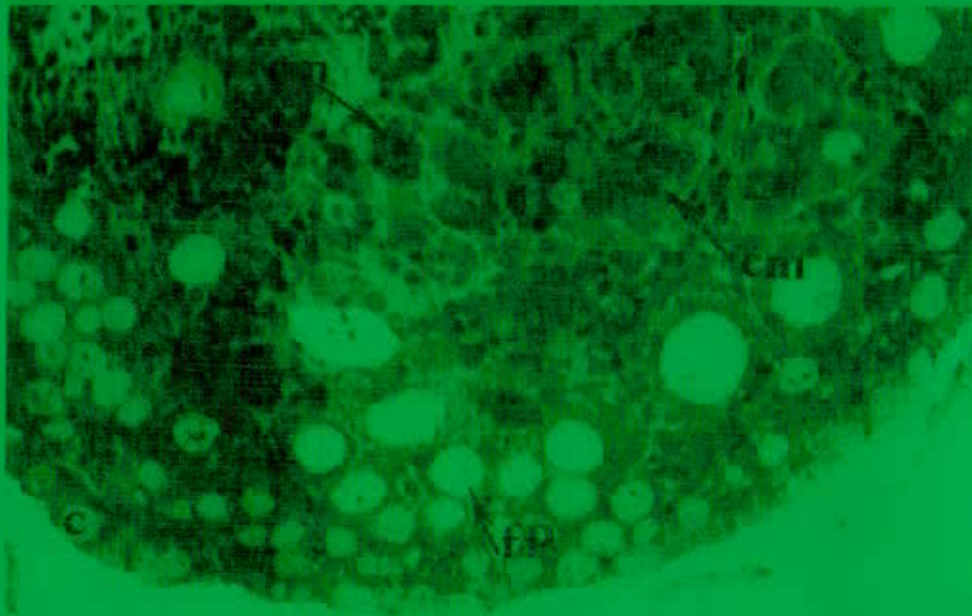


Figura 5. Ovario XY de 5 dpp. Se observan a los ovocitos (ov) en la zona cortical (c) y algunos folículos primarios (f) en esta región, hacia el interior se encuentran los cordones medulares (cm)(400X).

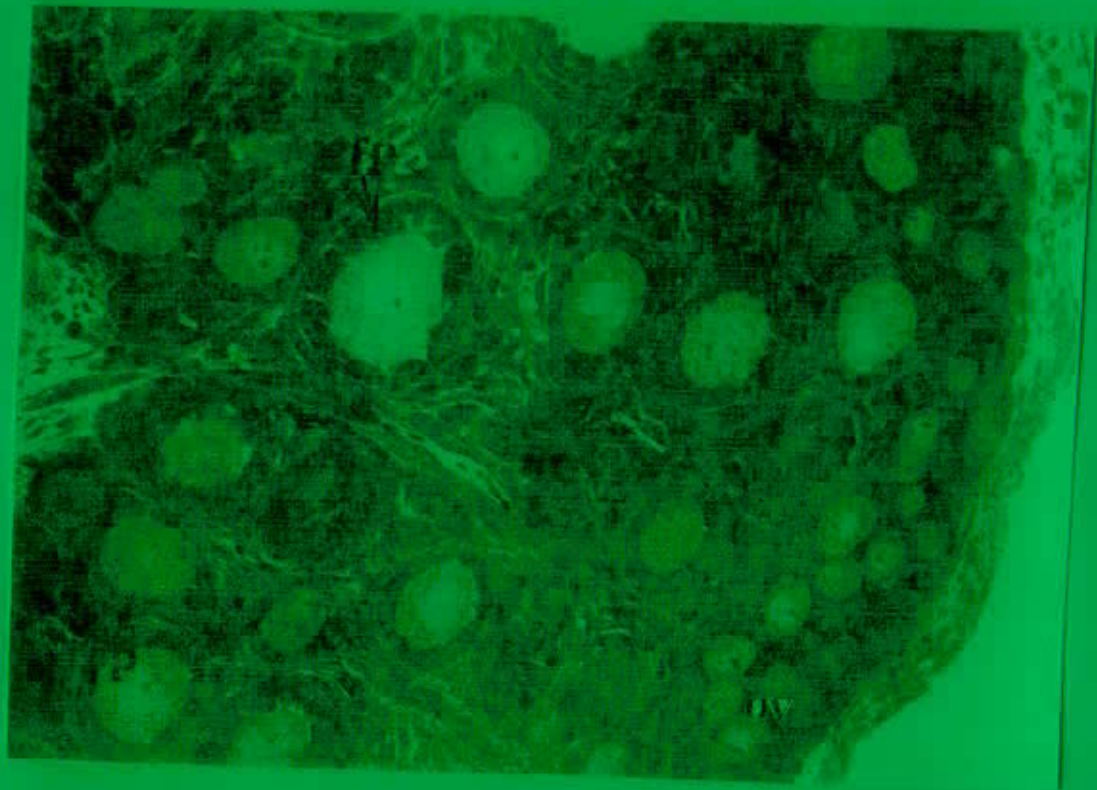


Figura 6. Ovario XX de 15 dpp, se observan grupos de ovocitos (ov) en la zona cortical (c) y varios folículos primarios (f) hacia la región medular (m) (600X)

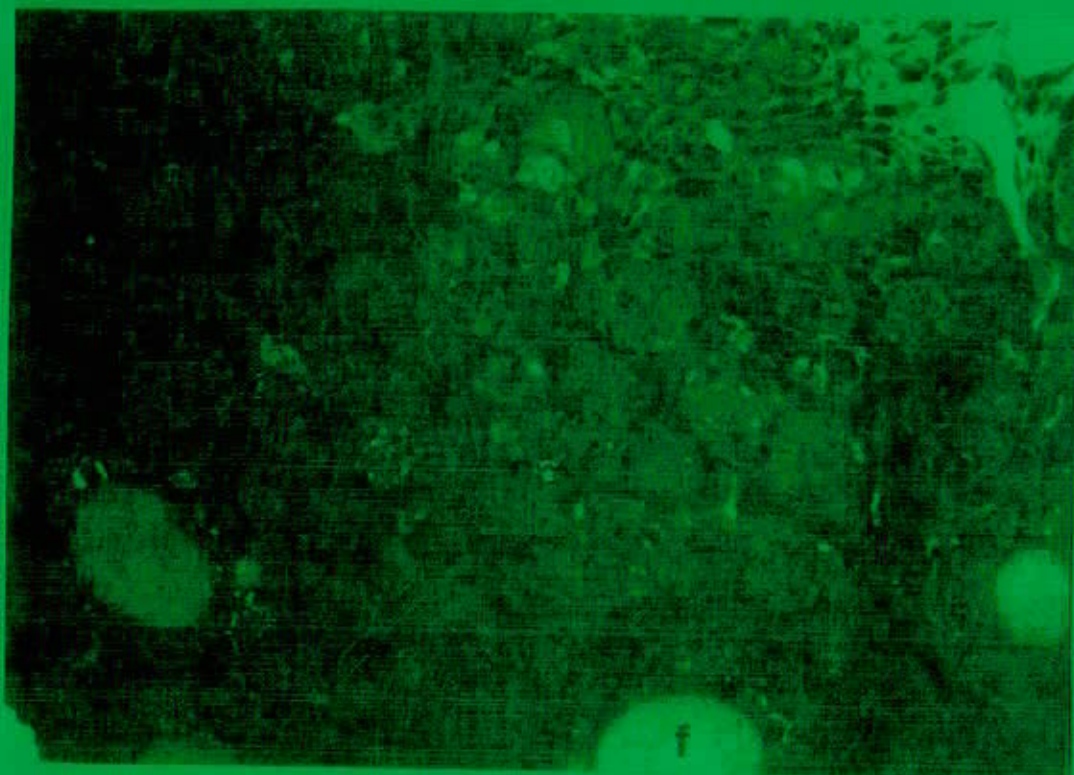


Figura 7. Ovario XY de 15 dpp en la región correspondiente a la corteza (c), se observan folículos (f) formados de varias capas de células de la granulosa (cg) y en la zona central los cordones medulares (cm). (600X).

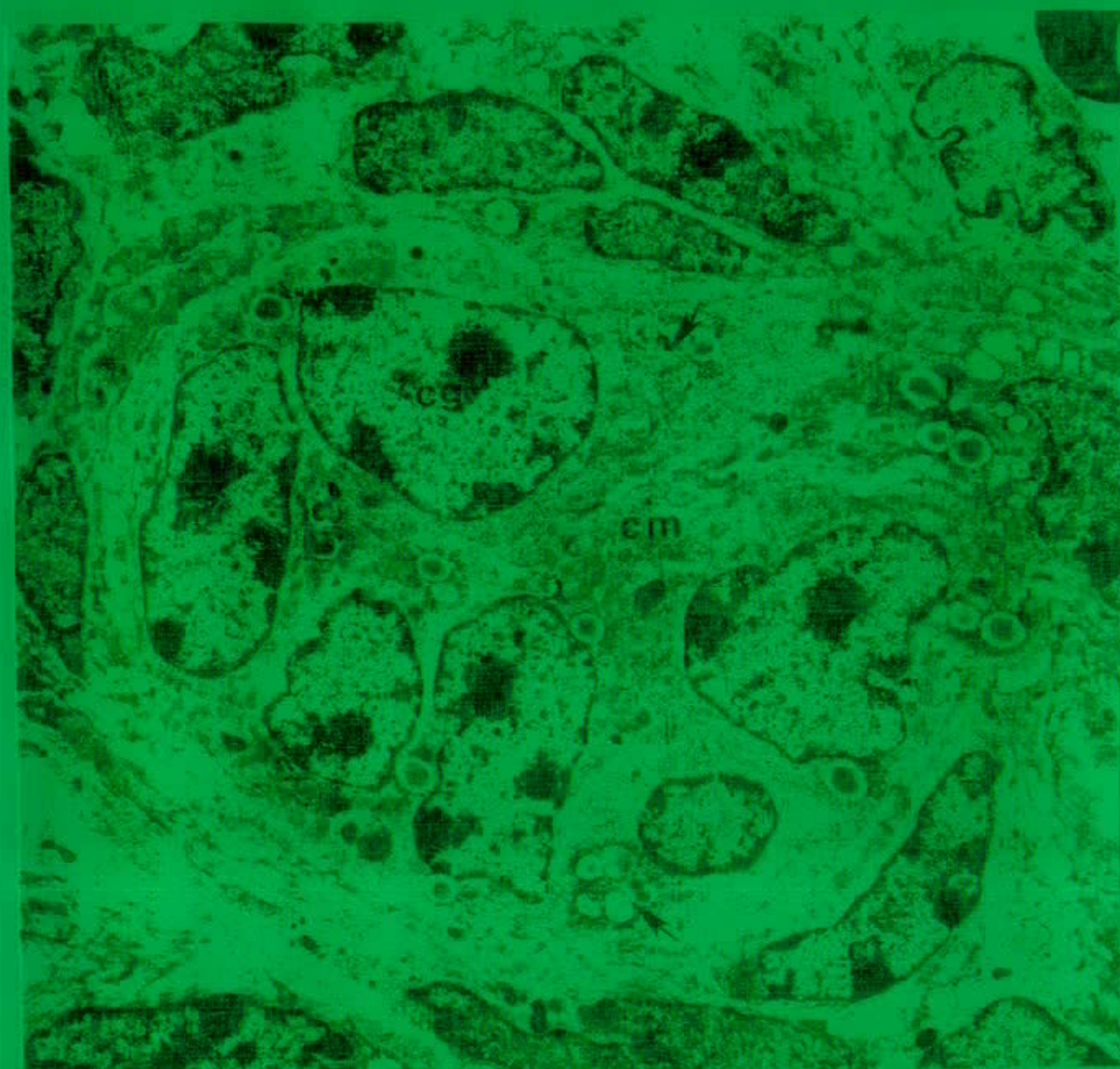


Figura 8. Ovario XY de 15 dpp en el que se muestra el aspecto ultraestructural de las células de la "granulosa" (cg) dentro de un cordón medular (cm). Se observan la presencia de algunas gotas lipídicas (flechas). Las células de la "teca" (ct) se encuentran por fuera bordeando los cordones medulares (12,500 X).

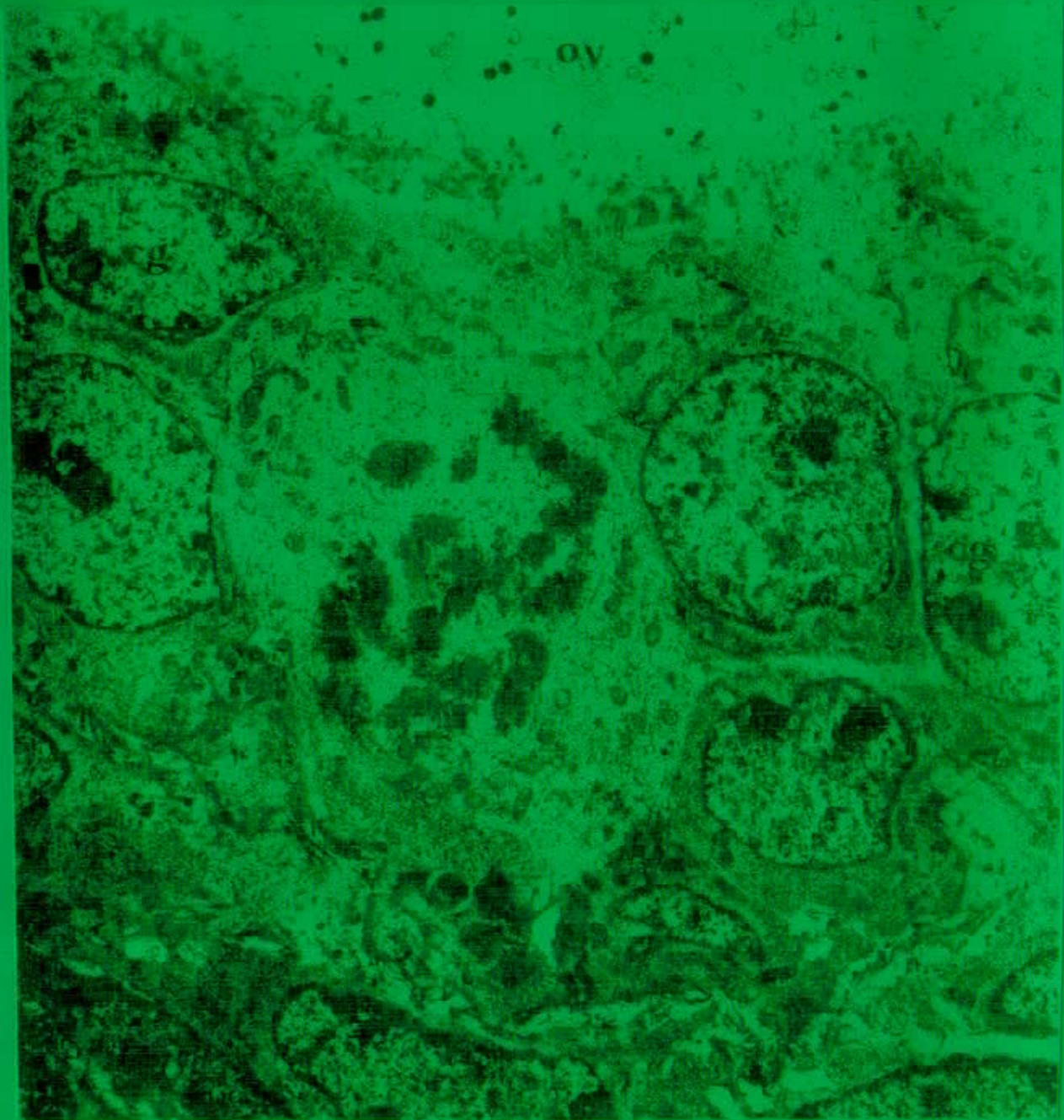


Figura 9. Vista parcial de un folículo localizado en la corteza del ovario XY en el que se observa parte de un ovocito (ov) y las células de la granulosa (cg). Una de las cuales se encuentra en mitosis (M)(12,500 X).

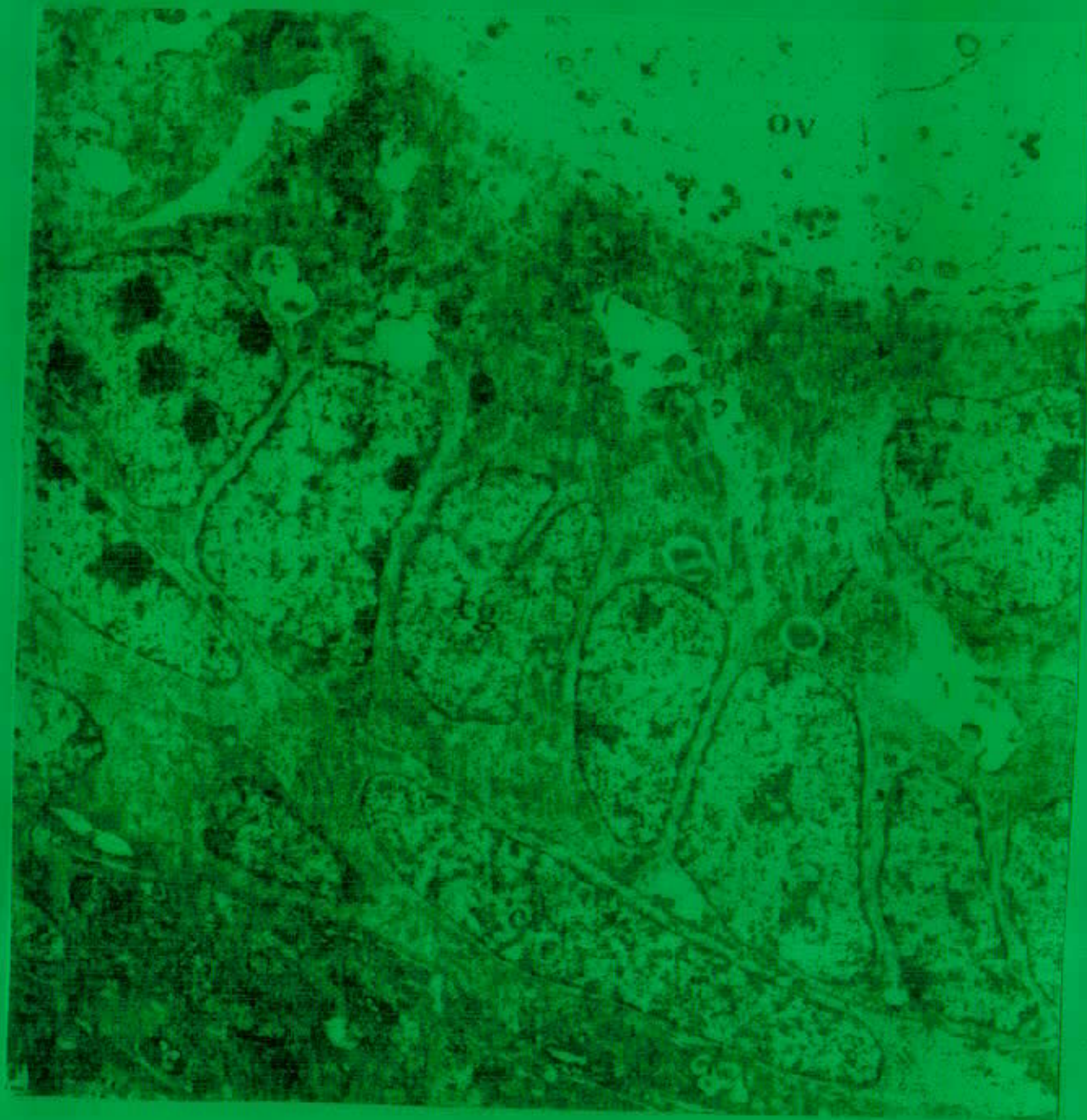


Figura 10. Aspecto ultraestructural de un ovario XY de 15 dpp, se ve un folículo en los límites de la zona cortical formado por capas de células de la granulosa (eg) que poseen algunas gotas lipídicas en el citoplasma. En la parte superior se observa parte de un ovocito (ov). Las células de la teca de forma alargada (ct) están localizadas alrededor del folículo (12,500 X).

### 1.1 Inmunolocalización del IGF-I

Por técnicas inmunocitoquímicas el IGF-I se localizó en los ovarios de las hembras XY de 1 a 20 dpp. Se observó que en los ovarios XX y XY de 1 a 10 dpp hay una reacción muy débil alrededor de las células foliculares en esta etapa inicial, donde el ovario está formado en su mayoría por folículos primordiales. La reacción se detectó más claramente hacia los 20 dpp en los ovarios XX, en los cuales se ubicó alrededor de los folículos en las células de la teca y de las intersticiales, y se observó muy ligeramente en las células de la granulosa (Figura 11). Asimismo, algunos ovocitos parecen reaccionar a la técnica inmunocitoquímica (Figura 11). En la misma etapa, el IGF-I se detecta en el ovario XY en las células de la teca de los folículos en crecimiento localizados en la corteza y en el intersticio, así como en células ubicadas en la *rete ovarii* y alrededor de los cordones carentes de ovocitos de la zona medular (Figura 12). En algunos folículos más desarrollados como los antrales algunas células de la granulosa parecen tener una reacción muy débil al IGF-I (Figura 12).

En el control (en el cual se omitió el anticuerpo primario) no se observó la inmunolocalización del IGF-I (Figura 13).



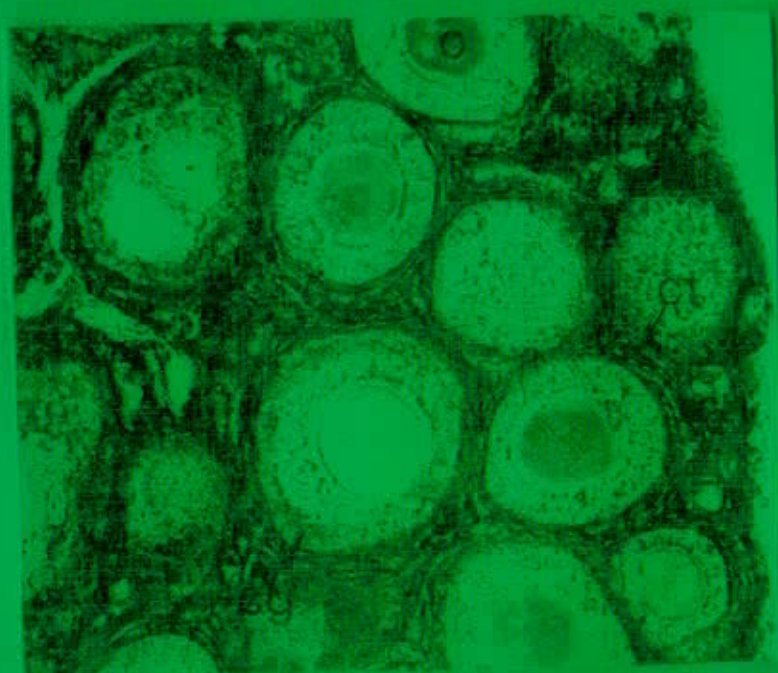


Figura 11. Corte transversal de un ovario XX de 20 dpp, se observa que el IGF-I se encuentra alrededor de las células de la teca (ct) y en la zona intersticial (i) del ovario. Las células de la granulosa (cg) son negativas a la reacción. En algunos folículos en desarrollo (secundarios y terciarios) se observó una reacción débil en el ovocito (400X).

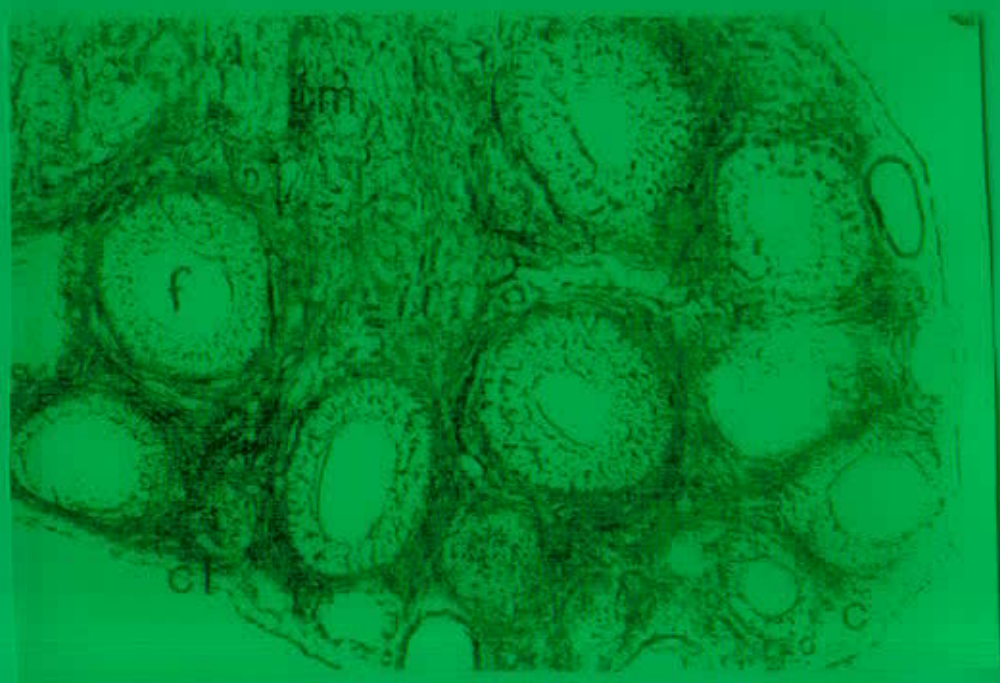


Figura 12. Ovario XY de 20 dpp, se ve la inmunolocalización del IGF-I en las células de la teca (ct) de los folículos (f) de la zona cortical (c). En la región correspondiente a los cordones medulares (cm) hay positividad al IGF-I en las células de la teca que los rodean (400X).

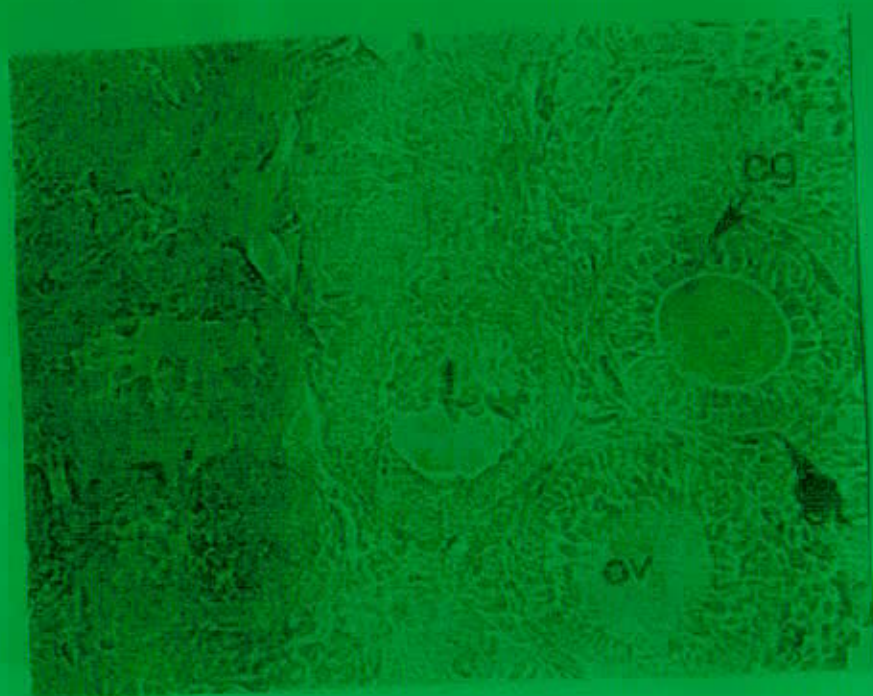


Figura 13. Ovario XX de 20 dpp, en el que se omitió el anticuerpo primario. No se visualizó ninguna reacción. Se observan folículos en diferentes etapas de desarrollo (f), ovocitos (ov), células de la granulosa (cg) y de la teca (ct) (400X).

## 1.2 Detección del RNAm del IGF-II en ovarios prenatales.

La expresión del IGF-II se detectó desde los 11 dg en el ovario XX, y su expresión se mantuvo en todas las etapas posteriormente estudiadas (figura 14). En cambio en el ovario XY la expresión de este factor se visualizó hasta los 13 dg. Aparentemente, la síntesis del IGF-II en el ovario XY se encuentra retardada con respecto al ovario XX (Figura 14)



Figura 14. Productos de la amplificación del RNAm del IGF-II obtenidos por PCR de los ovarios XX y XY de 11 a 18 dg. Los números pares del (2 al 30) corresponden al control de cada experimento (sin transcriptasa reversa) y los naves (1 al 31) al RNAm amplificado del IGF-II de ovarios XX (carriles 1,5,9,13,17,21,25 y 29) y de ovarios XY (carriles 3,7,11,15,19,23,27 y 31). El ovario XX empieza a producir este factor a partir del 11 dg y su expresión se mantiene en todas las etapas estudiadas. El asterisco (\*) indica la etapa a partir de la cual inicia la síntesis de IGF-II en el ovario XY (13 dg).

### 1.3 Detección del RNAm del IGF-I en ovarios postnatales

La expresión del RNAm del IGF-I, se estudió desde el nacimiento hasta los 20 dpp. En los ovarios XY se observó RNAm del IGF-I hasta los 15 días postparto, mientras que en los ovarios XX éste se visualizó desde el nacimiento (figura 15) y mantuvo su expresión en todas las etapas estudiadas. En el ovario XY el retraso en la síntesis del factor de crecimiento es mucho más evidente; la primera banda se detectó a los 15 dpp, ésta es menos densa que su homóloga y posteriormente su grosor es similar (figura 15).



Figura 15. Productos de PCR del IGF-I obtenidos a partir de la amplificación del RNA mensajero de los ovarios XX y XY de 1 a 20 dpp. Se observa que la síntesis del factor empieza en el ovario XX desde el primer día postpartum ( 1, 5, 9, 13, 17 ). Note la ausencia de las bandas de la misma edad ( 3, 7, 11 ). El asterisco (\*) indica la etapa a partir de la cual se inicia la síntesis de IGF-I en el ovario XY (15 dpp).

## VII. DISCUSION

En el presente estudio se empleó como modelo biológico el ovario XY del ratón B6Y<sup>POS</sup> el cual brindó la oportunidad de analizar fenómenos bioquímicos y moleculares que se llevan a cabo durante la diferenciación gonadal.

El análisis histológico de los ovarios XX y XY demostró diferencias en el arreglo de los componentes celulares, que se deben principalmente a la presencia de cordones medulares carentes de ovocitos en el ovario XY, los cuales están formados en su interior por células semejantes a las foliculares y externamente por células parecidas a las de la teca. Se sabe que las primeras tienen un origen epitelial y que las segundas provienen principalmente del mesénquima (Merchant y Centeno, 1981).

En un estudio realizado con una tinción inmunocitoquímica para la lámina basal (que separa diferentes componentes epiteliales) y anticuerpos específicos contra filamentos intermediarios de células epiteliales y mesenquimáticas, se corroboró que los cordones estériles en la zona medular, están constituidos externamente por células mesenquimatosas e internamente por células de tipo epitelial. Por lo tanto, los cordones medulares del ovario XY están conformados tanto por células epiteliales como mesenquimatosas (Guerrero-Ramírez, 1995 y Guerrero-Ramírez y Villalpando, datos en proceso). Estos datos sugieren que el cromosoma "Y" aparentemente no está interfiriendo con la diferenciación de los tipos celulares del ovario, sino con la expresión temporal y espacial de genes que participan en la síntesis de esteroides gonadales, durante diferentes estadios del desarrollo embrionario (Lee y Taketo, 1994) y postnatal.

En un estudio previo sobre la distribución del tejido productor de hormonas esteroides del ratón B6Y<sup>POS</sup>, se observó que la actividad de la enzima 3 $\beta$ -HSDH, clave en la biosíntesis de esteroides gonadales, se ubicó en las células de la teca y la granulosa, así como en la glándula intersticial en los ovarios XX control. En los ovarios XY la actividad de esta enzima se localizó en las células de la teca y de la granulosa de los ovocitos en desarrollo de la región cortical. Además, la reacción se observó en los cordones medulares (Villalpando y col, 1993). Asimismo, la combinación de la tinción histoquímica para la 3 $\beta$ -HSDH con laminina, glucoproteína que se encuentra presente en la lamina basal, demostró que las

células localizadas dentro y fuera de los cordones estériles están sintetizando esteroides (Villalpando-Fierro y col, datos en proceso).

En los últimos años, diversos estudios han demostrado que la causa de la baja producción de esteroides y los problemas de esterilidad asociados con el ovario XY, no se deben a fallas en el eje hipotálamo-hipófisis, sino a deficiencias intraováricas. Los experimentos realizados por Taketo-Hosotani y col. (1989) demostraron que aparentemente la hipófisis de la hembra XY funciona de manera normal, ya que cuando se transplantó un ovario XY a una hembra XX en la cápsula suprarrenal, se observó que esta última no era capaz de tener un ciclo estral regular y presentaba un diestro persistente. En el experimento inverso se vio que el trasplante de un ovario XX a una hembra XY no impedía la regularidad del ciclo estral de ésta

El funcionamiento normal de la hipófisis de la hembra XY fue recientemente corroborado al realizarse trasplantes ortotípicos de ovarios XX a hembras XY. Al cruzar las hembras que recibieron un ovario XX con machos B6Y<sup>POS</sup> éstas revirtieron su estado de esterilidad y tuvieron descendencia, lo cual sugiere nuevamente que el problema de la hembra XY radica en el ovario y/o en el ovocito (Marmolejo-Valencia y col. 1994).

En 1995, Guerrero-Ramírez y Villalpando (datos en proceso) procedieron a realizar la cuantificación de los niveles de AMPc endógenos en los ovarios B6Y<sup>POS</sup>, esto debido a que se desconoce la causa de la baja producción de esteroides gonadales y puesto que una de las características de los ovarios XY, en la etapa postnatal, es su incapacidad de incrementar la síntesis de testosterona bajo la acción de la FSH. Con este estudio se demostró que los valores de AMPc son similares en los ovarios XX y XY a los 14 y 35 dpp. Por lo tanto, la posible falla en la producción de esteroides no se debe a una deficiencia de este segundo mensajero en el ovario XY, al menos en las etapas postnatales evaluadas

El estudio de la expresión de los factores semejantes a insulina I y II es aún tema de controversia, debido a que los mecanismos de regulación intra y extraovárica en que participan son aún pobremente entendidos, tanto en la etapa embrionaria como en la postnatal. En la presente investigación se estudiaron los RNAm del IGF I y II de ovarios embrionarios y postnatales de hembras XX y XY. La expresión del IGF-II se visualizó a los 11 dg en el ovario XX control y su expresión se mantuvo en todas las etapas embrionarias

posteriormente estudiadas hasta antes del nacimiento. En el ovario XY la expresión del IGF-II se encuentra retrasada con respecto al ovario XX, es decir, se detectó hasta los 13 dg y en menor cantidad. Estos resultados plantean la posibilidad de que el IGF-II sea otro de los genes que se encuentran alterados durante la cascada de acontecimientos genéticos y moleculares que se llevan a cabo en la diferenciación testicular. Además, se observó que a los 18 dg hay una disminución del RNAm del IGF-II. Cabe aclarar que aunque con la técnica de PCR empleada no se tiene información de tipo cuantitativo, ésta da una idea sobre la expresión diferencial de los genes.

En un estudio reciente, Lee y Taketo (1994) demostraron que en la etapa embrionaria diversos marcadores de la diferenciación testicular se encuentran presentes, tanto en el ovario XX como en el XY. Entre estos están la hormona inhibidora de los conductos Mülllerianos y enzimas como la 17  $\alpha$ -hidroxilasa y  $\Delta^{4,5}$  3 $\beta$ -HSDH, las cuales intervienen en la biosíntesis de testosterona. Todos estos genes parecen expresarse de igual manera en ambos ovarios. Sin embargo, estos autores observaron que la expresión del RNAm de la aromatasa es el único que se encuentra retrasado 24 horas en el ovario XY en comparación al ovario XX control. La diferencia de 24 horas en la expresión del IGF-II en nuestros estudios, así como el retraso de la expresión del RNAm de la aromatasa (Lee y Taketo, 1994) refuerzan la hipótesis de que la diferenciación del testículo se encuentra alterada en la cascada de acontecimientos genéticos.

Es posible que la presencia del Sry esté retrasando la expresión del IGF-II en el ovario normal, el cual probablemente es requerido para otras funciones en la vida embrionaria. La baja producción del RNAm, un día después de que se ha iniciado el proceso de la meiosis, plantea la posibilidad de que este factor esté funcionando como una señal que activa la síntesis del factor facilitador de la meiosis, y/o podría estar funcionando como una señal para que se transcriban otros genes que participan en la diferenciación testicular.

Por otra parte, es posible que otros genes además del IGF-II estén alterados en la cascada de fenómenos que conllevan a la diferenciación testicular. Con este modelo se ha observado que la ruptura de los fenómenos moleculares que ocurren tienen repercusión en el desarrollo funcional del ovario en la vida postnatal.



Las hormonas gonadotrópicas como la LH y la FSH siguen siendo señales externas importantes en el control de la función ovárica. Sin embargo, se ha propuesto al IGF-I como un péptido intraovárico que estimula la síntesis de esteroides en las células de la granulosa en cultivo. La acción de este factor parece efectuarse sobre la expresión de los mensajeros de las enzimas clave durante el metabolismo de esteroides (Randall y col, 1990), y tal parece que para ejercer sus efectos requiere de la interacción directa con diferentes factores como la FSH, LH, GH y estrógenos.

Durante el análisis del mensajero del IGF-I en la etapas postnatales desde 1 hasta 20 dpp, se observó que éste se detecta a partir del primer dpp, y su expresión se mantiene en todas las etapas analizadas. En el ovario XY la expresión del RNAm está retrasada y se detecta a partir de los 15 dpp. Esto indica que la fuente intragonadal del IGF-I en los ovarios XY aparentemente se encuentra disminuída, y dadas las numerosas actividades de este factor, se supone que su ausencia afecta al ovario como a un todo. Probablemente al disminuir la actividad enzimática en algunos pasos clave durante la esteroidogénesis y/o evitar la multiplicación celular y con ello las últimas etapas de la diferenciación ovárica. Lo que finalmente da, como consecuencia, las características endócrinas de las hembras B6Y<sup>POS</sup> anteriormente señaladas (Taketo y col, 1989).

La acción del IGF-I aparentemente no está restringida al ovario, ya que varios estudios realizados durante el desarrollo embrionario de la glándula suprarrenal en los bovinos, demostraron que el IGF-I tiene un efecto claro en las células de la corteza, la cual participa en la producción de esteroides (Han y col, 1992). Asimismo, en las células de la granulosa porcina *in vitro* la producción del IGF-I es estimulada por FSH, estradiol y GH.

El retraso en la expresión del IGF-I probablemente provoca que muchas células de la granulosa no se dividan, tal vez este factor necesite interaccionar con otros péptidos que participan en el proceso de mitosis en el ovario. Sin embargo, aún queda por determinar el o los mecanismos por medio de los cuales este proceso ocurre. El RNAm del IGF-I se ha detectado por hibridación *in situ* únicamente en las células de la granulosa de folículos en desarrollo (Oliver y col, 1989).

Durante la expresión de los RNAm se ha visto que existen varias especies de transcritos cuyos valores son 7.0, 1.6, 0.4 y 0.9 Kb, mismos que han sido detectados

en diferentes tejidos (Hernández y col., 1989), estas observaciones son congruentes con los estudios de "Western-Blot" realizados en nuestro laboratorio, en donde se demostró la presencia de varias especies de IGF-I en el ovario. Asimismo, estos resultados plantean que existen varias subespecies del IGF-I en el ovario postnatal, sin embargo se desconoce si cada uno de estos transcritos tiene una función biológica diferente o sólo son moléculas transitorias durante el proceso de maduración del IGF-I.

Anteriormente señalamos que el proceso del desarrollo gonadal está controlado por varios elementos, y al estudiar uno de ellos (la familia del factor de crecimiento tipo IGF), se tiene sólo una idea parcial del funcionamiento del ovario. Puesto que uno de los factores de importancia para el proceso de foliculogénesis es el IGF-I, tal vez las anomalías que se presentan en el ovario XY son una consecuencia de los bajos niveles de IGF-I en la zona medular. Quizá otra de las vías que probablemente se encuentre alterada sea el número de receptores funcionales a FSH en el ovario XY. De tal manera, que si esta gonadotropina está abatida y la expresión del mensajero del IGF-I es tardía, se produzca una reducción en el número de células de la granulosa y por lo tanto en la producción de esteroides gonadales.

La presencia de los mensajeros del IGF-I y II señala sólo eventos transcripcionales, mas no su traducción, secreción, ni los fenómenos colaterales que aparentemente son controlados por otros factores como las proteínas de unión y sus receptores (Adashi, 1993). En el presente estudio se trató de establecer una relación entre la expresión del RNAm del IGF-I y su localización en ovarios XX y XY. En el ovario XX el IGF-I fue localizado en las zonas intersticial y de la teca, pero no en las células foliculares. En los ovarios XY, la reacción fue similar en los folículos de la zona cortical, pero además se detectó una reacción débil y poco localizada en las células "de la teca" de los cordones medulares.

Los resultados obtenidos en el presente estudio con la inmunodetección del IGF-I no están de acuerdo con los datos anteriormente reportados en otras especies de mamíferos, en donde la localización del IGF-I se ha descrito en las células de la granulosa principalmente (Oliver y col, 1989 y Randall y col, 1990). Se sabe que las células de la granulosa son el sitio de síntesis del IGF-I en el ovario, mientras que las células de la teca y la glándula intersticial son los sitios de recepción y de acción (Hammond y col, 1985 y Adashi y col, 1986). Sin embargo, se ha visto que las células de la teca en la rata aparentemente producen IGF-I

(Hernández y col, 1990). En el ovario de la rata la función fundamental del IGF-I parece estar estrechamente relacionada con los folículos en crecimiento en esta especie (Carlsson y col, 1989).

La mayoría de estudios que se conocen han empleado como modelo biológico a la rata, mientras que el ratón no se ha usado como modelo de experimentación en esta área. La diferencia en la localización del IGF-I en el ovario del ratón, tal vez se deba a una diferencia de especie, aunque ambas estén cercanamente relacionadas en la escala filogenética. Es posible que en el control de la esteroidogénesis también existan diferencias específicas de especie y que los requerimientos estimulatorios para este proceso sean distintos. En el hamster se ha propuesto que además del IGF-I, se necesita la presencia del factor de crecimiento fibroblástico y epidérmico para la producción de esteroides (Shyamal y Greenwlad, 1991).

Es importante señalar que hacia los 15 dpp, etapa en la que empieza la producción de IGF-I en los ovarios XY, el proceso de foliculogénesis ya se ha iniciado (Merchant y Chimal-Monroy, 1989) y la falta del factor de crecimiento quizás afecta el desarrollo normal folicular. Es posible que el IGF-I actúe como un elemento inductor del desarrollo folicular o participe en la maduración del ovocito, puesto que su presencia se requiere desde el primer día postparto. Asimismo, se ha propuesto que este factor podría estar actuando también como un selector del folículo en maduración (Clemmons, 1989).

Los factores semejantes a insulina I y II son agentes mitogénicos potentes y factores promotores de la diferenciación que regulan el crecimiento y la diferenciación de muchos tejidos, que incluyen a las células de la granulosa de folículos en desarrollo (Oliver y col, 1989). En la rata se ha visto que hay una variación del IGF-I durante el ciclo estral, detectándose los niveles más altos durante el proestro y el estro (Carlsson y col, 1989).

El análisis global de la presente investigación plantea que probablemente las características anormales de las hembras B6Y<sup>POS</sup> estén asociada con la ausencia de los IGF, pero no podemos asegurar que dependan por completo de éstos. Sin embargo, es evidente la importancia de este factor y su papel como inductor durante el proceso de diferenciación gonadal. Tal vez los efectos señalados en este estudio se deban, además de la ausencia de IGF- I y II, a otros elementos que participen de manera activa en el desarrollo de las gónadas.

Para analizar el efecto neto del IGF-I en la producción de esteroides en el ovario del ratón XY, habría que realizar cultivos in vitro de células de la teca y de la granulosa en presencia y ausencia del IGF, y evaluar la producción de progesterona, testosterona y 17  $\beta$  estradiol.

## VIII. CONCLUSIONES

1. Los cordones medulares de ovario XY de 15 dpp están conformados por células epiteliales y mesenquimatosas.
2. La expresión del RNAm del IGF-I y II está retrasada en el ovario XY tanto en la etapa embrionaria como en la postnatal.
3. La localización del IGF-I en el ratón B6Y<sup>POS</sup> es diferente al demostrado en la rata y en el humano. En la hembra XY las células foliculares carecen casi por completo de este factor, mismo que se localiza predominantemente en la región de la teca y zona intersticial.
4. El retraso en la expresión del IGF-I y II en el ovario XY es un factor a considerar para explicar las alteraciones que se observan en la hembra adulta.

## IX. BIBLIOGRAFÍA CITADA

**Adashi, E.Y; Resnick, C.E; Svoboda, M.E. y Van Wyk, J.J.** 1984. A novel role for somatomedin-C in the differentiation of the ovarian granulosa cells. *Endocrinology* **115**: 1227-1229.

**Adashi, E.Y; Resnick, C.E; D'Ercole, A.J; Svoboda, M.E. y Van Wyk, J.J.** 1985. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev* **6**: 400-420.

**Adashi, E.Y; Resnick, C.E; Svoboda, M.E. y Van Wyk, J.J.** 1986. Follicle-stimulating hormone enhances somatomedin C binding to cultured rat granulosa cells. *J Biol Chem* **261** (9): 3923-3926.

**Adashi, E.Y; Resnick, C.E; Hernández, E.R; Svoboda, M.E. y Van Wyk, J.J.** 1988. Characterization and regulation of a specific cell membrane receptor for somatomedin-C/Insulin-like growth factor I in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* **122**: 194-201.

**Adashi, E.Y; Resnick, C.E; Hernández, E.R; Hurwitz, A. y Rosenfeld, R.G.** 1990. Follicle stimulating hormone inhibits the constitutive release of insulin-like growth factor binding proteins by cultured rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* **126**: 1305-1307.

**Adashi, E.Y.** 1993. Intraovarian Regulation: The Proposed Role of Insulin-Like Growth Factors. En: *Intraovarian Regulators and Polycystic Ovarian Syndrome*. Tolis, G; Bringer, J y Chrousos, G.P. Eds. *Ann N Y Acad Sci* **687**: 10-12.

**Ballesteros, M; Scott, C.D. y Baxter, R.C.** 1990. Development regulation of insulin-like growth factor-II/Mannose 6-Phosphate receptor mRNA in the rat. *Biochem Biophys Res Com* **172** (2): 775-779.

**Beck, F; Samani, N.J; Penschow, J.D; Thorley, B; Tregear, G.W y Brammar, W.J.** 1987. Histochemical localization of IGF-I and IGF-II mRNA in the developing rat embryo. *Development* **101**: 175-184.

**Beck, F; Samani, N.J; Byrne, S; Morgan, K; Gebhard, R y Brammar, W.J.** 1988. Histochemical localization of IGF-I and IGF-II mRNA in the rat between birth and adulthood. *Development* **104**: 29-39.

**Bell, G.I; Gerhard, D.S; Fong, N.S; Sánchez-Pescador, R y Rall, L.B.** 1985. Isolation of the human insulin-like growth factor genes: insulin-like growth factor II and insulin genes are contiguous. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6450-6454.

**Bell, G.I; Stempien, M.M; Fong, N.M y Rall, L.B.** 1986. Sequences of liver cDNA encoding two different mouse insulin-like growth factor-I precursors. *Nucleic Acid Res* **14**: 7873-7882.

- Bellin, M.E y Ax, R.L.** 1984. Chondroitin sulfate: an indicator of atresia in bovine follicles. *Endocrinology* **114**: 428-437.
- Binoux, M; Hossenlopp, P; Hardouin, S; Seurin, D; Lassarre, C y Gourmelen, M.** 1986. Somatomedin (Insulin-like growth factors)-binding proteins. Molecular forms and regulation. *Hormone Res* **24**: 141-151.
- Bondy, C.A; Werner, H; Roberts, Ch.T y 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. *Molec Endocrinol* **4**: 1386-1398.
- Brissenden, J.E; Ullrich, A y Francke, U.** 1984. Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature* **310**: 781-784.
- Brown, A.L; Graham, D.E; Nissley, S. P; Hill, D.J; Strain, A.J y Rechler, M.M.** 1986. Developmental regulation of insulin-like growth factor II mRNA in different rat tissues. *J Biol Chem* **261**: 13144 -13150.
- Byskov, A.G y Hoyer, P.E.** 1988. Embryology of mammalian gonads and ducts. En: *The Physiology of reproduction*. Knobil, E y Neill, J. Eds Vol 1 Raven Press N Y.
- Camacho-Hubner, C; Busby, W.H; McCusker, R.H; Wright, G y Clemmons, D.R.** 1992. Identification of the forms of insulin-like growth factor binding proteins produced by human fibroblast and the mechanisms that regulate their secretion. *J Biol Chem* **267** (17): 11949-11956.
- Carlsson, B; Carlsson, L y Billig, H.** 1989. Estrous cycle dependent co-variation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) messenger ribonucleic acid and protein in the ovary. *Mol Cell Endocrinol* **64**: 271-275.
- Chomczynski, P y Sacchi, N.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159.
- Christman, G.M; Randolph, J.F; Peegel, H y Menon, K.M.J.** 1991. Differential responsiveness of luteinized human granulosa cells to gonadotrophins and insulin-like growth factor I for induction of aromatase activity. *Fertil Steril* **55** (6): 1099-1105.
- Clark, J.M y Eddy, E.M.** 1975. Fine structural observations on the origins and associations of primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol* **47**: 136-155.
- Clemmons, D.R.** 1984. Multiple hormones stimulate the production of somatomedin by cultured human fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* **58**: 850-856.

**Clemmons, D.R y Van Wyk, J.J.** 1985. Evidence for a functional role of endogenously produced somatomedin-like peptides in the regulation of DNA synthesis in cultured human fibroblasts and porcine smooth muscle cells. *J clin Invest* **75**: 1914-1918.

**Clemmons, D.R.** 1989. Structural and functional analysis of insulin-like growth factors. *British Med Bull* **45** (2): 465-480.

**Czech, M.P.** 1989. Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell* **59**: 235-238.

**Daughaday, W.H y 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.

**De Pagter-Holthuizen, P; Jansen, M; Van Schaik, F.M.A; Van der Kammen, R; Oosterwijk, C; Van der Brade, J.L y Sussenbach, J.S.** 1987. The human insulin-like growth factor II contains two development specific promoters. *FEBS Lett* **214**: 259-264.

**Eicher, E.M; Washburn, L.L; Whitney III, J.B y Morrow, K.E.** 1982. Mus poschiavinus Y Chromosome in the C57BL/6J murine genome causes sex reversal. *Science* **217** (6): 535-537.

**Elgin, R.G; Busby, W.H y Clemmons, D.R.** 1987. An insulin-like growth factor binding protein enhances the biological response to IGF-I. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 3313-3318.

**Farkash, Y; Timberg, R y Orly, J.** 1986. Preparation of antiserum to rat cytochrome P<sub>450</sub> cholesterol side chain cleavage, and its use for ultrastructural localization of the immunoreactive enzyme by protein A-gold technique. *Endocrinology* **118**: 1353-1365.

**Froesch, E.R; Schmid, Chr; Schwander, J y Zapf, J.** 1985. Actions of insulin-like growth factors. *Ann Rev Physiol* **47**: 443-467.

**Guerrero-Ramírez, S.** 1995. Diferenciación y regulación de la actividad endócrina del ovario XY. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

**Gore-Langton, R.E y Armstrong, D.T.** 1988. Follicular steroidogenesis and its control. En: *The physiology of reproduction*. Knobil, E y col Editors Raven Press N Y.

**Hall, K y Sara, V.R.** 1983. Growth and somatomedins. *Vit Horm* **40**: 175-233.

**Hall, P.F.** 1984. Cellular organization for steroidogenesis. *Int Rev Cytol* **86**: 53-95.

**Hammond, J.M; Baranao, J.L.S; Skaleris, D; Knight, A.B; Romanus, J.A y Rechler, M.M.** 1985. Production of Insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells. *Endocrinology* **117**: 2553-2555.



- Han, V.K.M; Lu, F; Bassett, N; Yang, K.P; Delhanty, P.J.D y Challis, J.R.G.** 1992. Insulin-like growth factor-II (IGF-II) messenger ribonucleic acid is expressed in steroidogenic cells of the developing ovine adrenal gland: evidence of an autocrine/paracrine role for IGF-II. *Endocrinology* **131**: 3100-3109.
- Hernández, E.R; Resnick, C.E; Svoboda, M.E; Van Wyk, J.J; Payne, D.W y Adashi, E.Y.** 1988. Somatomedin-C / Insulin-like growth factor I as an enhancer of androgen biosynthesis by cultured rat ovarian cells. *Endocrinology* **122**: 1603-1612.
- Hernández, E.R; Roberts, Ch.T; LeRoith, D y Adashi, E.Y.** 1989. Rat ovarian insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression is granulosa cell-selective: 5'-untranslated mRNA variant representation and hormonal regulation. *Endocrinology* **125**: 219-227.
- Hill, D.J.** 1979. Stimulation of cartilage zones of the calf costochondral growth plate *in vitro* by growth hormone-dependent rat plasma somatomedin activity. *J Endocrinol* **83**: 219-227.
- Holly, J.M.P y Wass, J.A.H.** 1989. Insulin-like growth factors; autocrine, paracrine or endocrine? New perspectives of the somatomedin hypothesis in the light of recent developments. *J Endocrinol* **122**: 611-618.
- Hoyt, E.C; Hepler, J.E; Van Wyk, J.J y Kay, Lund, P.** 1992. Structural characterization of exon 6 of the rat IGF-I gene. *DNA Cell Biol* **11** (6): 433-441.
- Hsueh, A.J.M; Adashi, E.Y; Jones, P.B.C y Welsh, T.H.** 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev* **5**: 76-114.
- Jansen, M; Van Schaik, F.M.A; Ricker, A.T; Bullok, B; Woods, D.E; Gabbay, K.H; Nussbaum, A.L; Sussenbach, J.S y Van den Braunde, J.L.** 1983. Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature* **306** (8): 608-611.
- Jost, A; Vigier, B; Prepin, J y Perchellet, J.P.** 1973. Studies on sex differentiation in Mammals. *Rec Prog Horm Res* **29**: 1-41.
- Karnovsky, M.J.** 1965. A Formaldehyde-Glutaraldehyde fixated of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* **27**: 137-142.
- Kiess, W; Haskell, J.F; Lee, L; Greestein, L.A; Miller, B.E; Aarons, A.L; Rechler, M.M y Nissley, S.P.** 1987. An antibody that blocks insulin-like growth factor (IGF) binding to the type II IGF receptor is neither against nor an inhibitor of IGF stimulated biologic response in L-6 myoblasts. *J Biol Chem* **262**: 12745-12751.
- Kofman-Alfaro, S; Merchant-Larios, H y Pérez-Palacios, G.** 1982. Diferenciación sexual. *Rev Invest Clin (Mex)* **34**: 349-359.

- Lee, J.E; Pintar, J y Efstratiadis, A.** 1990. Pattern of the insulin-like growth factor II gene expression during early mouse embryogenesis. *Development* **110**: 151-159.
- Lee, C.H y Taketo, T.** 1994. Normal onset but prolonged expression of Sry gene in the B6Y<sup>DOM</sup> sex-reversed mouse gonad. *Dev Biol* **165**: 442-452.
- LeRoith, D; Werner, H; Faria, T.N; Kato, H; Adamo, M y Roberts, Ch.T.** 1993. Insulin-Like Growth Factor Receptors. En: *The Role of Insulin-Like Growth Factors in the Nervous System*. Raizada, M.K y LeRoith, D. Editors *Ann N Y Acad Sci* **692**: 22-32.
- Levinovitz, A y Norstedt, G.** 1989. Development and steroid hormonal regulation of insulin-like growth factor II expression. *Molec Endocrinol* **3**: 797-804.
- Luft, J.H.** 1961. Improvements in epoxy resins embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* **9**: 409-416.
- Magoffin, D.A; Kurtz, K.M y Erickson, G.F.** 1990. Insulin-like growth factor-I selectively stimulates Cholesterol side-chain cleavage expression in ovarian theca-interstitial cells. *Molec Endocrinol* **4**: 489-496.
- Marmolejo-Valencia, J.A; Nishioka, Y y Merchant-Larios, H.** 1994. Fertilidad de la hembra C57BL/6J Y<sup>POS</sup>. Memoria de los resúmenes del XXXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. A.C. Mérida, Yucatán.
- McLaren, A.** 1985. Relation of germ cell sex to gonadal differentiation. En: *The origin and evolution of sex*. Monroy, A. Editor Alan R. Liss N Y.
- McLaren, A.** 1991. The making of male mice. *Nature* **351**: 96.
- Merchant, H.** 1975. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev Biol* **41**: 1-21.
- Merchant, H.** 1976. The role of germ cells in the morphogenesis and cytodifferentiation of the rat ovary. En: *Progress in Differentiation Research*. Müller-Berat, C. Editor North Holland, Amsterdam.
- Merchant, H y Centeno, U.B.** 1981. Morphogenesis of the ovary from the sterile W/Wv mouse. En: *Advances in the morphology of cells and tissues*. Acosta, V.E. Editor Alan R. Liss N Y.
- Merchant, H y Chimal-Monroy, J.** 1989. The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. *Dev Ultrastruc Reprod* **296**:55-63.

- Moses, A.C; Nissley, S.P; Short, P.A; Rechler, M.M; White, R.M; Knight, A.B y Higa, O.Z.** 1980. Increased levels of multiplication-stimulating activity, an insulin-like growth factor, in fetal rat serum. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 3649-3653.
- Muller, U y Urban, E.** 1981. An oocyte-specific antigen and its possible role in the organization of the ovarian follicle of the rat. *Differentiation* **20**: 274-277.
- Murphy, L.J; Murphy, L.C y Friesen, H.G.** 1987. Estrogen induces insulin-like growth factor-I expression in the rat uterus. *Molec Endocrinol* **1**: 445-450.
- Nagamine, C.M; Taketo, T y Koo, G.C.** 1987. Morphological development of the mouse gonad in tda-1 XY ser reversal. *Differentiation* **33**: 214-222.
- Nakatani, A; Shimasaki, S; Erickson, G.F y Ling, N.** 1991. Tissue-specific expression of four insulin-like growth factor-binding proteins (1, 2, 3 and 4) in the rat ovary. *Endocrinology* **129**: 1521-1529.
- Nishioka, Y y Lamothe, E.** 1986. Isolation and characterization of a mouse Y chromosomal repetitive sequence. *Genetics* **113**: 417-432.
- Nishioka, Y.** 1988. Application of Y chromosomal repetitive sequences to sexing mouse embryos. *Teratology* **38**: 181-185.
- Oliver, J.E; Aitman, T.J; Powell, J.F; Wilson, C.A y Clayton, R.N.** 1989. Insulin-like growth factor I gene expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of the developing follicles. *Endocrinology* **124**: 2671-2679.
- Randall, J; Urban, J.C.G; Shupnik, M.A y Veldhuis, D.** 1990. Insulin-like growth factor type I increases concentrations of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P<sup>450</sup> cholesterol side chain cleavage enzyme in primary cultures of porcine granulosa cells. *Endocrinology* **127**: 2481-2488.
- Rinderknecht, A y Humbel, R.** 1976. Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell growth promoting activity in human serum: isolation, chemical characterization and some biological properties. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 2365-2369.
- Rinderknecht, A y Humbel, R.** 1978. The aminoacid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with insulin. *J Biol Chem* **253**: 2769-2776.
- Roy, S.K y Greenwald, G.S.** 1991. *In vitro* effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, fibroblast growth factor, and follicle stimulating hormone on Hamster follicular deoxyribonucleic acid synthesis and steroidogenesis. *Biol Reprod* **44**: 889-896.
- Sambrook, J; Fritsch, E.F y Maniatis, T.** 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Schmid, C; Steiner, T y Froesch, E.R.** 1984. Insulin-like growth factor I supports differentiation of cultured osteoblasts-like cells. *FEBS Lett* **173**: 48-52.
- Shaw, H.J; Boddy, S.E y Hodges, J.K.** 1993. Developmental changes in marmoset granulosa cell responsiveness to insulin-like growth factor-I: Interactions with follicle-stimulating hormone and estradiol. *Biol Reprod* **49**: 568-576.
- Shyamal, K.R y Greenwald, G.S.** 1991. *In vitro* effects of epidermal growth factor, insulin like growth factor-I, fibroblast growth factor and follicle-stimulating hormone on hamster follicular deoxyribonucleic acid synthesis and steroidogenesis. *Biol Reprod* **44**: 889-896.
- Spatola, E; Pescovitz, O.H; Marsh, K; Johnson, N.B; Berry, S.A y Gelato, M.C.** 1991. Interaction of growth hormone-releasing hormone with the insuline-like growth factors during prenatal development in the rat. *Endocrinology* **129**: 1193-1200.
- Spaventi, R; Antica, M y Pavelic, K.** 1990. Insulin-like growth factor I (IGF-I) in early mouse embryogenesis. *Development* **108**:491-495.
- Steenberg, P.H; Koonen-Reemst, A.M.C.B; Cleutjens, C.B.J.M y Sussenbach, J.S.** 1991. Complete nucleotide sequence of the high molecular weight human IGF-I mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **175** (2): 507-514.
- Stempien, M.M; Fong, N.M; Rall, L.B y Bell, G.I.** 1986. Sequence of a placental cDNA encoding the mouse insulin-like growth factor II precursor. *DNA* **5**: 357-361.
- Taketo-Hosotani, T; Nishioka, Y; Nagamine, C.M; Villalpando, I y Merchant-Larios, H.** 1989. Development and fertility of ovaries in the B6Y<sup>DOM</sup> sex-reversed female mouse. *Development* **107**: 95-105.
- Telford, N.A; Hogan, A; Franz, C.T y Schultz, G.A.** 1990. Expression of genes for insulin and insulin-like growth factors and receptors in early postimplantation mouse embryos and embryonal carcinoma cells. *Mol Reprod Dev* **27**: 81-92.
- Tiersch, T.R; Mitchell, M.J y Wachtel, S.S.** 1991. Studies on the phylogenetic conservation of the SRY gene. *Hum Genet* **87** (5): 571-573.
- Turo, K y Florini, J.** 1982. Hormonal stimulation of myoblast differentiation in the absence of DNA synthesis. *Am J Physiol* **243**: C278-C289.
- Urban, R.J; Garmey, J.J; Shupnik, M.A y Veldhuis, J.D.** 1990. Insulin-like growth factor type I increases concentrations of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P<sub>450</sub> Cholesterol side-chain cleavage enzyme in primary cultures of porcine granulosa cells. *Endocrinology* **127**: 2481-2488.

**Veldhuis, J.D y Hammond, J.M.** 1979. Multiplication activity regulates ornithine decarboxylase in isolated porcine granulosa cells *in vitro*. *Endocrine Res Commun* **6**: 299-305.

**Veldhuis, J.D; Rodgers, R.J; Dee, A y Simpson, E.R.** 1986. The insulin-like growth factor, somatomedin C, induces the synthesis of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P<sub>450</sub> and adrenodoxin in ovarian cells. *J Biol Chem* **261**: 2499-2502.

**Villalpando, I; Nishioka, Y y Taketo, T.** 1993. Endocrine differentiation of the XY sex-reversed mouse ovary during postnatal development. *J Steroid Biochem Molec Biol* **45** (4): 265-273.

**Zapf, J y Froesch, E.R.** 1986. Insulin-like growth factors / Somatomedins: Structure, secretion, biological actions and physiological role. *Hormone Res* **24**: 121-130.

**Zetterqvist, H.** 1956. The ultrastructural organization of the columnal absorbing cell of the mouse jejunum. Doctoral Thesis, Karolinska Institute. Estocolmo, Suecia.

## X. APÉNDICE

### Aislamiento del plásmido recombinante:

#### a) Crecimiento

A dos tubos de ensayo se les agregaron 5 ml del medio Luria y 62.5 µg de tetraciclina. A uno de estos se le añadieron 200 a 300 µl del cultivo bacteriano que posee el plásmido recombinante y ambos se incubaron a 37°C en agitación constante toda la noche. Al día siguiente se añadieron 6,625 g de tetraciclina al medio Luria restante y 1.5 ml del medio en el que crecieron las bacterias. Este se incubó de 2 a 3 horas hasta que alcanzó una absorbencia de 0.7 a 0.75. Luego se agregaron 170 mg/lt de cloranfenicol y se incubó a 37°C en agitación constante toda la noche. Al día siguiente el medio se centrifugó a 7,000 rpm, 10 minutos a 4°C, se decantó y el sedimento se congeló en hielo seco 10 minutos. Luego se le agregaron 5 ml de sacarosa al 25% en Tris 50 mM, pH 8.0, 1 ml de EDTA 0.25 M, pH 8.0 y 2.5 ml de lisozima (5 mg/ml), se mezcló e incubó 15 minutos a 4°C. Se preparó la solución lítica con 1.50 ml de EDTA 0.5 M, pH 8.0, 0.60 ml de Tris 1M pH 8.0, 0.12 ml de Tritón al 10% disuelto en EDTA 0.25 M, pH 8.0 y 2.22 ml de agua estéril.

#### b) Extracción y purificación

Se añadieron 3.5 ml de la solución lítica y se incubó 15 minutos a 4°C. Se centrifugó a 18,000 rpm por 30 minutos, se colectó el sobrenadante en un tubo Córrex y se añadieron 200 µl de RNAsa (5mg/ml). Se incubó a 37°C, 30 minutos y se agregó 1 ml de pronasa (5 mg/ml) y se incubó por 30 minutos. Se añadieron 4 ml de fenol y 4 ml de una solución de cloroformo-álcohol isoamílico en proporción 24:1. Se agitó por 5 minutos y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se colectó en otro tubo y se le añadieron 20 ml de etanol absoluto y 500 µl de NaCl 5 M. Se mezcló y se dejó precipitando toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugó a 10,000 rpm y se lavó el sedimento con 10 ml de etanol 70%. Luego la muestra se dejó secar y se resuspendió en 3 ml de amortiguador TE, 100 µl de NaCl 5 M y 4.5 ml de etanol absoluto. Se dejó precipitar en hielo seco durante 1 hora y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos. Se decantó, se lavó

con etanol 70% y se centrifugó de nuevo a 14,000 rpm por 15 minutos. Se resuspendió en amortiguador 6-6-0.2 y se determinó la concentración del plásmido por espectrofotometría.

#### **Amortiguador TE:**

Tris	10 mM pH 8.0
EDTA	1 mM pH 8.0

#### **Digestión del plásmido:**

Se tomaron 2 µg del plásmido en un tubo eppendorf y se agregaron 14 µl de agua con DEPC, se mezcló suavemente y se añadieron 2 µl de la enzima de restricción Eco R1 (10 U / µl) y 2 µl del amortiguador 2. Se mezcló todo suavemente en el vórtex, esta solución se incubó a 37°C 24 horas y se detuvo la digestión al añadir 0.41 µl de EDTA 0.5 M, pH 8.0.

#### **Purificación de la sonda 145SC5:**

El plásmido digerido se corrió en un gel de agarosa al 1% a 100 Volts durante 40 minutos. Se tiñó con bromuro de etidio 0.5 mg/ml, 15 minutos y se observó en un transiluminador. La banda correspondiente a la sonda 145SC5 se cortó, se introdujo en una membrana con 500 µl de amortiguador TBE y se electroeluyó durante 30 minutos a 100 Volts. Posteriormente se colectó el amortiguador y se añadió un volumen igual de etanol absoluto y 100 µl de LiCl 4 M. Se dejó toda la noche a -20°C y al día siguiente se centrifugó a 14,000 rpm 20 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se secó en un desecador a 4°C por 2 horas. Finalmente el sedimento se resuspendió en agua tratada con DEPC y se leyó su concentración por espectrofotometría.

#### **Preparación de agua tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC):**

A dos litros de agua destilada y se le agregaron 2 ml de DEPC y se mantuvo en agitación constante hasta que éste se disolvió. Posteriormente se sumergió en esta solución el material a tratar y se esterilizó 45 minutos a una presión de 15 lb/cm<sup>2</sup> (2 veces).

#### **Cromatografía en columna:**

Se preparó Sephadex G-50 al 33% en amortiguador 6-6-0.2 y se virtió en una columna preparada con una jeringa de insulina de 1 ml a la que se le puso un tapón de fibra de vidrio. Esta se colocó en un tubo Córex y se centrifugó a 2,000 rpm por 2 minutos. Se desechó el

amortiguador colectado y se aplicó la muestra radioactiva. Se centrifugó a 2,000 rpm durante 5 minutos y se tomó una alícuota de 1  $\mu$ l para leer su actividad en el contador de centelleo. Finalmente la sonda marcada y purificada se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Amortiguador 6-6-0.2:**

Tris	6.0 mM
NaCl	6.0 mM
EDTA	0.2 mM
H <sub>2</sub> O-estéril	

**Amortiguador SET:**

EDTA	0.5 M pH 8.0
Tris-HCl	0.5 M pH 8.0
H <sub>2</sub> O-estéril	

**Solución de hibridación:**

SSC	5X
N-Lauroilsarcocinato de sodio	0.1 %
Formamida	50.0 %
SDS	0.2 %
H <sub>2</sub> O-DEPC	

**Solución SSC 1X:**

NaCl	3.0 M
Citrato de sodio	0.3 M
H <sub>2</sub> O-estéril	

**Solución denaturalizante ("D"):**

Se preparó la solución base de isotiocianato de guanidina. Se tomaron 100 g de tiocianato de guanidina y se agregaron 117.2 ml de H<sub>2</sub>O-DEPC. Luego se añadieron 7.04 ml de citrato de sodio 0.75 M, pH 7.0 y 10.56 ml de sarcocil al 10% en agua. Para preparar la solución "D" se tomaron 50 ml de la solución base y se añadieron 360  $\mu$ l de 2 $\beta$ -Mercaptoetanol. Esta solución se puede almacenar a temperatura ambiente un mes.



**Fenol saturado con H<sub>2</sub>O:**

El fenol (50 ml) se estabilizó a temperatura ambiente, luego se colocó en baño María a 45° y se agregó un volumen de agua estéril tratada con DEPC. Se sacó del baño María y se mantuvo en agitación constante 30 minutos, posteriormente se retiró el agua con un sistema de vacío y se añadieron 0.05 g de hidroxiquinoleína y un volumen de agua-DEPC. Se agitó durante 30 minutos a TA y luego se le retiró el agua. Finalmente se agregaron 100 µl de 2β-Mercaptoetanol, un volumen de agua y se mantuvo en agitación constante por 30 minutos. Esta solución se puede almacenar tres meses a 4°C.

**Amortiguador TBE 1X:**

TRIS	1 M
Acido Bórico	1 M
EDTA	0.5 M pH 8.0
H <sub>2</sub> O estéril	1000 ml

**Azul de Bromofenol para PCR:**

Azul de bromofenol	0.12 %
Glicerol	30.00 %

**Medio Luria**

Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Disolver todos los solutos en 800 ml de H<sub>2</sub>O. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5 N y aforar el volumen a 1 litro con agua desionizada. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 15 lb/cm<sup>2</sup> en ciclo húmedo.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**